

FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA NA BARREIRA INTESTINAL, POR MEIO DO  
TESTE DE PERMEABILIDADE E DOSAGEM DE CALPROTECTINA FECAL, EM  
PACIENTES COM DOENÇA DE CROHN, EM RESPOSTA AO TRATAMENTO  
COM TERAPIA BIOLÓGICA (ANTICORPOS ANTI-TNF ALFA)**

GABRIELA SANTANA ATALIBA

BELO HORIZONTE, MG

2015

GABRIELA SANTANA ATALIBA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto, área de concentração Ciências Aplicadas ao Aparelho Digestivo, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Medicina.

Orientadora: Profa. Maria de Lourdes de Abreu Ferrari

Co-Orientador: Prof. Eduardo Garcia Vilela

Faculdade de Medicina  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte - MG  
2015

## **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Reitor:** Prof. Jaime Arturo Ramírez

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

**Pró Reitor da Pós-Graduação:** Prof. Rodrigo Antônio de Paiva Duarte

### **FACULDADE DE MEDICINA**

**Diretor:** Prof. Tarcizo Afonso Nunes

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

#### **Centro de Pós-Graduação**

**Coordenadora:** Profa. Sandhi Maria Barreto

**Subcoordenadora:** Profa. Ana Cristina Côrtes Gama

**Chefe do Departamento de Clínica Médica:** Prof. Unaí Tupinambás

#### **Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto**

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

**Subcoordenador:** Prof. Paulo Caramelli

#### **Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto**

Prof. Marcus Vinícius Melo de Andrade

Profa. Sarah Teixeira Camargos

Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Prof. Eduardo Garcia Vilela

Profa. Gilda Aparecida Ferreira

Profa. Luciana Costa Faria

Profa. Rosângela Teixeira

Profa. Silvana Spíndola de Miranda

Prof. Paulo Caramelli

Prof. Aloísio Sales da Cunha

Profa. Valéria Maria Azeredo Passos

Profa. Maria de Fátima Haueisen Sander

Andréa de Lima Bastos(Disc. Titular)

Luisa Campos Caldeira Brant(Disc. Suplente)

Dedico este trabalho aos meus pais, pelo apoio e amor incondicionais

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que de alguma maneira contribuíram para realização deste trabalho, direta ou indiretamente.

À minha orientadora, Maria de Lourdes de Abreu Ferrari, por me conduzir neste caminho, tão árduo mas tão gratificante. Pela generosidade em compartilhar das suas experiências e conhecimento. Pelo apoio e encorajamento aos outros rumos da vida acadêmica e profissional.

Ao meu co-orientador, Eduardo Garcia Vilela, responsável por muito do meu crescimento acadêmico neste tempo. Por dividir as aflições e conquistas no laboratório, por seu espírito questionador que sempre me estimulou e por servir de exemplo pela excelência no que faz.

Ao professor Aloísio Sales da Cunha pelo envolvimento nas atividades do laboratório, pela dedicação, e pelo carinho.

À toda equipe do Ambulatório de Intestino do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas - UFMG: às secretárias (em especial Adriana Damaris), aos residentes, aos preceptores e médicos.

Aos acadêmicos do laboratório do Grupo de Pesquisas da Barreira Gastrointestinal, pelo auxílio constante.

Aos amigos da pós-graduação: Annanda, Geyza e Chico, por dividirem os anseios e pela ajuda mútua.

Aos pacientes, pela confiança e entrega. Sem eles, nada disto seria possível. Participar de uma pesquisa científica como voluntário exige altruísmo.

À minha família: meus pais, Sérgio e Maria Lúcia, por prover todo o suporte necessário; minha irmã Carol, por muitas vezes ser meu contraponto de vista na vida; minhas tias Graça e Eleuza por me acompanharem sempre de perto.

Ao Daniel, pelo amor, por me entender, me encorajar e compreender as atenções divididas.

Aos meus amigos (Laços, Funil, UFOP e da vida afora), pela escuta e presença constantes.

**"O ato criador, seja na ciência ou arte, surge sempre de uma dor. Não é preciso que seja uma dor doída. Por vezes, a dor aparece como aquela coceira que tem o nome de curiosidade"**

**(Rubem Alves)**

## RESUMO

A doença de Crohn (DC) caracteriza-se por inflamação intestinal crônica, que pode acometer qualquer segmento do trato digestivo, da boca ao ânus. O tratamento atualmente disponível possibilita o controle da atividade da doença e o alívio dos sintomas, mas não proporciona a cura. O epitélio intestinal possui diferentes propriedades, promovendo tanto a função de barreira, quanto a função de transporte de substâncias presentes na luz intestinal. Sabe-se que a permeação às macromoléculas aumenta em processos que causa reação inflamatória na mucosa intestinal. O presente estudo teve como objetivo avaliar, de forma prospectiva, a associação da terapia biológica (anticorpos anti-TNF- $\alpha$ ) ao processo inflamatório e à recuperação da barreira intestinal, de pacientes com DC. Para tal, foram avaliados indivíduos com DC com indicação de uso de infliximabe ou adalimumabe, no período entre agosto de 2012 e agosto de 2014. Os pacientes se submeteram à avaliação clínica; revisão laboratorial de marcadores inflamatórios séricos (Proteína C reativa e velocidade de hemossedimentação); quantificação do grau de atividade da doença de Crohn, por meio do *Crohn's Disease Activity Index* (CDAI); teste de permeabilidade intestinal, por meio da excreção urinária de açúcares e dosagem de calprotectina fecal, antes e após terapia de indução com anticorpos anti-TNF- $\alpha$ . 22 pacientes participaram do estudo, sendo 59,1% do sexo feminino, com idade média de  $38,0 \pm 12,8$  anos. A maior parte (63,6%) obteve o diagnóstico da DC entre 17 a 40 anos de idade; a mesma proporção de pacientes apresentou acometimento ileocolônico. Em relação ao comportamento da DC, 45,4% dos pacientes apresentaram o perfil penetrante. Observou-se tendência à diminuição da permeabilidade intestinal após o tratamento com anticorpos anti-TNF- $\alpha$ , de 0,0082 para 0,0059 ( $p=0,057$ ). Tanto a avaliação do índice de atividade da doença (CDAI), quanto os marcadores séricos de atividade inflamatória e a dosagem de calprotectina fecal, não apresentaram diferença entre as avaliações ( $p>0,05$ ). Houve correlação positiva entre os valores de PCR e permeabilidade intestinal (coeficiente=0,519,  $p=0,033$ ) e os níveis de calprotectina fecal e VHS (coeficiente=0,678,  $p=0,031$ ), ambos após o tratamento de indução da remissão

**Palavras chaves:** Doença de Crohn, permeabilidade intestinal, calprotectina fecal.

## ABSTRACT

Crohn's disease (CD) is characterized by chronic intestinal inflammation that may affect any part of the digestive tract, from mouth to anus. The currently available treatment allows the disease activity control and the symptoms relief, but does not provide a cure. The intestinal epithelium has different properties and thus acts as a barrier as well as substances transport in the intestinal lumen. It is known that the macromolecules permeation increases over the course of inflammation caused through processes in the intestinal mucosa. This study aimed at the assessment, on a prospective basis, of the biological therapy association (anti-TNF- $\alpha$  antibodies) to the inflammatory process and the intestinal barrier recovery in patients with CD. To do so, individuals with CD were evaluated, who had infliximab or adalimumab usage statement, between August 2012 and August 2014. Patients underwent clinical evaluation; laboratory review of serum inflammatory markers (C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate); Activity degree evaluation of the CD through the *Crohn's Disease Activity Index* (CDAI); intestinal permeability test through the sugars urinary excretion and the calprotectin fecal dosing, before and after induction therapy with anti-TNF- $\alpha$  antibodies. 22 patients participated in the study, 59.1% female,  $38.0 \pm 12.8$  years of mean age. The majority (63.6%) had the CD diagnosis between 17 and 40 years of age which was the same proportion of patients with ileocolonic diagnosis. For the CD behavior, 45.4% of patients had the penetrating profile. A downward intestinal permeability trend was perceived after treatment with anti-TNF- $\alpha$  antibodies, 0.0082 to 0.0059 ( $p=0.057$ ). Both CDAI, as serum markers of inflammatory activity and the fecal calprotectin dosage showed no difference between assessments ( $p>0.05$ ). There was positive correlation between PCR values, and intestinal permeability (coefficient=0.519,  $p=0.033$ ) and both fecal calprotectin and ESR levels (coefficient=0.678,  $p=0.031$ ), both after the remission induction treatment.

**Keywords:** Crohn's disease, intestinal permeability, fecal calprotectin.



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Classificação de Montreal (Silverberg <i>et al</i> , 2005).....	8
Quadro 2: Índice de atividade inflamatória na doença de Crohn (Best <i>et al</i> , 1976) <sup>49</sup> .....	28
Quadro 3: Distribuição dos 22 pacientes por faixa etária .....	33
Quadro 4: Distribuição dos 22 pacientes de acordo com a idade ao diagnóstico da DC, segundo a Classificação de Montreal <sup>24</sup> .....	33
Quadro 5: Distribuição dos 22 pacientes de acordo com a localização da doença, segundo a Classificação de Montreal <sup>24</sup> .....	34
Quadro 6: Distribuição dos 22 pacientes de acordo com o comportamento da doença, segundo a Classificação de Montreal <sup>24</sup> .....	34
Quadro 7: Frequência do uso dos medicamentos, antes do início da terapia com os e anticorpos anti-TNF- $\alpha$ , nos 22 pacientes com doença de Crohn.....	35
Quadro 8 : Valores de manitol, lactulose e permeabilidade intestinal antes e após o tratamento com anti-TNF- $\alpha$ . .....	37
Quadro 9: Correlação de Spearman para os valores da permeabilidade intestinal e calprotectina fecal, antes e após o tratamento com terapia biológica. ....	39
Quadro 10: Análise das correlações entre permeabilidade intestinal e demais parâmetros inflamatórios (correlação de Spearman). ....	39
Quadro 11: Análise das correlações entre calprotectina fecal e demais parâmetros inflamatórios (correlação de Spearman). ....	40

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cromatograma de amostra de urina de um dos pacientes participantes do estudo. (Lactulose: tempo de retenção = 9,875; manitol: tempo de retenção = 11, 871).....	29
Figura 2: Curva de calibração e equação da reta para a lactulose .....	30
Figura 3: Curva de calibração e equação da reta para o manitol .....	30
Figura 4: Box-plot para valores de permeabilidade intestinal em T0, T1 e de indivíduos saudáveis .....	36
Figura 5: Error-plot para valores de dosagem de manitol em T0, T1 e para grupo controle.....	37
Figura 6: Box-plot para valores de dosagem de lactulose em T0, T1 e para grupo controle.....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS

DII - Doença inflamatória intestinal

RCU - Retocolite ulcerativa

DC - Doença de Crohn

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa

VHS - Velocidade de hemossedimentação

PCR - Proteína C reativa

TGI - Trato gastrointestinal

5-ASA - ácido 5- aminossalicílico

AZA - Azatioprina

6-MP - 6-mercaptopurina

Ig - Imunoglobulina

CDAI - *Crohn's Disease Activity Index*

NF-  $\kappa$ B - Fator nuclear kappa B

GWAS - *Genome-wide association study*

IL - Interleucina

IFN-  $\gamma$  - Interferon gama

Th - T helper

ZO - Zônula de oclusão

PRRs - Receptores reconhecedores de padrão

Da - Dáltons

PEG - Polietilenoglicol

HBI - *Harvey-Bradshaw Index*

ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

HC - Hospital das Clínicas

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

mL - Mililitro

mg - Miligrama

$\mu\text{m}$  - Micrômetro

g - Grama

HPLC - *High Performance Liquide Chromatography*

vol - Volume

g/L - Grama por litro

$\mu\text{g/L}$  - Micrograma por litro

DP - Desvio padrão

q1 - Quartil 25%

q3 - Quartil 75%

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	5
2.1	OBJETIVO GERAL .....	5
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	5
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	6
3.1	INTRODUÇÃO.....	6
3.2	ETIOPATOGENIA .....	12
3.2.1	<i>Fatores ambientais</i> .....	12
3.2.2	<i>Fatores genéticos</i> .....	13
3.2.3	<i>Fatores microbianos</i> .....	15
3.2.4	<i>Fatores imunológicos</i> .....	16
3.3	BARREIRA INTESTINAL .....	17
3.4	PERMEABILIDADE INTESTINAL .....	20
3.4.1	<i>Avaliação da Permeabilidade Intestinal</i> .....	22
3.5	MARCADORES DE ATIVIDADE INFLAMATÓRIA .....	24
<b>4</b>	<b>PACIENTES E MÉTODOS</b> .....	27
4.1	ÍNDICE DE ATIVIDADE INFLAMATÓRIA NA DOENÇA DE CROHN.....	27
4.2	PERMEABILIDADE INTESTINAL .....	28
4.3	CALPROTECTINA FECAL .....	31
4.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	32
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	33
5.1	ÍNDICE DE ATIVIDADE INFLAMATÓRIA NA DOENÇA DE CROHN.....	35
5.2	AVALIAÇÃO DOS MARCADORES BIOQUÍMICOS DE ATIVIDADE INFLAMATÓRIA .....	35
5.3	PERMEABILIDADE INTESTINAL .....	36
5.4	CALPROTECTINA FECAL .....	38
5.5	CORRELAÇÕES P DE SPEARMAN .....	38
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	41
6.1	LIMITAÇÕES DO ESTUDO .....	45
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	46
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	47

<b>9</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>55</b>
----------	--------------------	-----------

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são representadas principalmente por duas entidades: a retocolite ulcerativa (RCU) e a doença de Crohn (DC). A enfermidade atualmente denominada de doença de Crohn não é afecção nova, haja vista a existência de relatos compatíveis desde a Grécia Antiga e Alexandria. Soranus de Éfeso (170 d.C.) descreveu em seu livro uma afecção muito semelhante à DC. Porém, o reconhecimento definitivo como enfermidade clínica, para a forma ileal da doença, ocorreu somente após a publicação do trabalho de Crohn, Ginzburg e Oppenheimer, em 1932.<sup>1</sup>

A DC pode acometer qualquer segmento do trato gastrointestinal, da boca ao ânus, embora possua maior propensão a comprometer o íleo terminal e o cólon proximal. São características da doença o acometimento segmentar do trato gastrointestinal, e a possibilidade de a inflamação estender-se para todas as camadas da parede intestinal, desde a mucosa até à serosa. É doença crônica, cujas intervenções terapêuticas visam induzir e manter a remissão da doença, a fim de restaurar a qualidade de vida do paciente e evitar complicações futuras.<sup>2;3</sup>

Indivíduos acometidos apresentam principalmente diarreia e dor abdominal, frequentemente acompanhadas de emagrecimento. Fístulas e estenoses são complicações comumente observadas, além da ocorrência de manifestações extraintestinais, tais como acometimento articular, dermatológico, oftalmológico, dentre outros.<sup>4</sup>

A etiologia da DC não está completamente esclarecida. Contudo, sabe-se que a doença se desenvolve em pessoas geneticamente susceptíveis, em consequência da interação de fatores ambientais, microbiota intestinal e fatores da imunorregulação. O aumento da passagem de antígenos através da mucosa intestinal induz a ativação inadequada do sistema imune, ocasionando inflamação crônica. Essas interações determinam os diferentes fenótipos clínicos e a história natural da doença.<sup>2;5</sup>

O diagnóstico da DC baseia-se nas manifestações clínicas associadas aos aspectos endoscópicos, radiológicos e histopatológicos. Biomarcadores imunológicos e fecais também têm sido utilizados. É necessário destacar a importância do diagnóstico diferencial, principalmente entre a DC e RCU. Na maior parte das vezes, quanto mais aguda e intensa a manifestação clínica da doença, mais difícil o diagnóstico diferencial entre elas, em razão do processo inflamatório ser acentuado e inespecífico, ou do acometimento de segmentos comuns a ambas.<sup>6;7</sup>

A DC apresenta maiores taxas de incidência em países desenvolvidos, como nos Estados Unidos da América e países do norte europeu. A Ásia, África e América do Sul são consideradas áreas de baixa incidência da doença. Entretanto, a incidência das doenças inflamatórias intestinais vem aumentando com o desenvolvimento e a urbanização de grupos populacionais. Fatores ambientais constituem importante aspecto na emergência de DII em áreas que anteriormente possuíam baixa prevalência de DII.

Estudo pioneiro realizado no Brasil, entre 1986 e 2005, com objetivo de estimar a incidência de DII no estado de São Paulo, demonstrou aumento desta de 0,4 por 100.000 pessoa/ano para 3,5 por 100.000 pessoa/ano para DC, no período entre os anos de 1986 e 2005.<sup>8</sup>

A urbanização parece constituir importante fator de risco para o desenvolvimento da DC, assim como a ocidentalização do estilo de vida, aspectos que podem explicar a tendência ao aumento das taxas de incidência da doença. A análise de populações migrantes sugere que as diferenças na prevalência observada entre os diversos grupos étnicos e raciais estariam mais relacionadas ao estilo de vida e às influências ambientais do que a diferenças genéticas propriamente ditas.<sup>9; 10</sup>

Disfunções da barreira intestinal são observadas em processos inflamatórios intestinais e têm sido apontadas como importante fator na patogênese da DC. O aumento da permeabilidade intestinal em pacientes com DC e em seus parentes de primeiro grau servem de evidência para essa observação. Estudos sugerem que defeitos preexistentes nas junções firmes permitem o aumento da permeação de antígenos luminais tóxicos, determinando inflamação intestinal. Recentemente, o melhor conhecimento dos fatores genéticos veio demonstrar a importância da imunidade inata na etiopatogênese das DII. Anormalidades no sistema de monitorização e remoção de bactérias, nos mecanismos de defesa contra moléculas tóxicas, no complexo juncional apical da barreira intestinal e na sinalização da imunidade inata têm sido apontados como fatores importantes na gênese das DII.<sup>11; 12</sup>

Embora o epitélio intestinal represente o limite físico entre o meio interno e externo, existem outros elementos que formam a barreira mucosa intestinal, como a camada de muco e os elementos subepiteliais responsáveis pela resposta imune inata e adaptativa. A expressão permeabilidade intestinal relaciona-se à função de barreira exercida pelo epitélio e se traduz pela propriedade deste epitélio de permitir a passagem de moléculas por meio do mecanismo de difusão não mediada, dependente do gradiente de concentração e sem assistência de um sistema carreador bioquímico, passivo ou ativo.<sup>11; 13</sup>



A quebra da integridade da barreira mucosa tem sido associada a mecanismos etiopatogênicos comuns a várias doenças de caráter inflamatório do trato digestivo. Acredita-se que o excesso de antígenos e bactérias que atingem o organismo através da luz intestinal está associado a fenômenos de ordem imunológica, não apenas no trato digestivo. A permeabilidade intestinal aumentada é interpretada como um mecanismo que permite a apresentação de antígenos luminiais ao sistema imune da mucosa intestinal, dando início à inflamação. A predisposição genética para responder a um antígeno luminal de forma acentuada, somada à presença do antígeno que determine a resposta imune e à apresentação do mesmo ao sistema imunológico da mucosa, provavelmente representem as etapas para o desenvolvimento da DC.

A avaliação da integridade da mucosa intestinal realizada pelo teste de permeabilidade é feito por meio da medida da excreção urinária de açúcares, não metabolizáveis, administrados por via oral. A partir da medida da taxa de excreção de macromoléculas, como a lactulose, podemos dimensionar ou mesmo retratar a quebra de barreira intestinal. Frequentemente, o manitol é empregado em conjunto com esse dissacarídeo para a avaliação da permeabilidade intestinal. Ambos representam os marcadores mais utilizados na prática clínica. A literatura registra diferentes formas de expressar e avaliar os valores de lactulose e manitol na urina: taxa lactulose/manitol, taxa lactulose/creatinina e excreção de lactulose na urina, coletada durante 5 horas e mensurada como porcentagem da dose administrada por via oral. Entretanto, ainda não está estabelecido se a quebra da barreira intestinal desencadeia a DC ou se o aumento da permeabilidade intestinal é consequência da inflamação crônica.<sup>5; 14; 15</sup>

O tratamento clínico da DII visa à rápida e sustentada remissão dos sintomas, com a normalização dos escores de atividade clínica da doença, dos exames bioquímicos e remissão endoscópica. O arsenal terapêutico para tratamento da DC inclui os corticosteroides, derivados salicílicos, antibióticos, imunossupressores e a terapia biológica.

O processo inflamatório crônico subclínico, que muitas vezes persiste a despeito da remissão clínica, é responsável pela lesão estrutural permanente do trato gastrointestinal. O tratamento da inflamação subclínica tem sido proposto, com o objetivo de minimizar os possíveis danos inflamatórios. A cicatrização da mucosa é considerada como fator preditivo do prognóstico em longo prazo e quando alcançada, resulta na diminuição do uso de esteroides, do número de recidivas, de internações hospitalares e intervenções cirúrgicas.<sup>16; 17</sup>

A terapia biológica mostra-se capaz de cicatrizar a mucosa intestinal inflamada e tem nos anticorpos contra o Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (anti-TNF- $\alpha$ ) seu principal representante no tratamento da DC<sup>18</sup>

Além da escolha da terapia adequada, outros aspectos como o diagnóstico, prognóstico, avaliação da atividade e gravidade da doença constituem desafios na prática clínica. Não há um padrão-ouro único que avalie todos esses aspectos e, por isso, geralmente aplica-se uma combinação da avaliação clínica com exames bioquímicos, radiológicos, endoscópicos e histológicos. Marcadores bioquímicos têm sido utilizados por diversas razões, já que permitem a mensuração objetiva da atividade da doença e evitam ou diminuem o emprego de métodos invasivos, tais como a colonoscopia. Considerando as características ideais que um marcador deve possuir, como rapidez e facilidade de mensuração, reprodutibilidade entre pacientes e laboratórios, possibilidade de detectar atividade da doença, avaliar os efeitos do tratamento, entre outros, destacam-se três marcadores: proteína-C reativa, velocidade de hemossedimentação e calprotectina fecal.<sup>19; 20</sup>

Dessa forma, o presente estudo propõe-se a utilizar métodos não invasivos para avaliar os efeitos da terapia biológica, principalmente sobre o processo inflamatório e sobre a barreira mucosa, em pacientes com DC, além de correlacionar as respostas desses marcadores.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar de forma prospectiva a associação da terapia biológica (anticorpos anti-TNF- $\alpha$ ) ao processo inflamatório intestinal e à recuperação da barreira intestinal, de pacientes com DC, utilizando-se o teste de permeabilidade intestinal e correlacionado-o a outros marcadores inflamatórios, antes e após o tratamento.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a permeabilidade intestinal antes e após o tratamento com terapia biológica (anticorpos anti-TNF- $\alpha$ )
- Quantificar a calprotectina fecal antes e após o tratamento com terapia biológica (anticorpos anti-TNF $\alpha$ )
- Avaliar a velocidade de hemossedimentação (VHS) e os níveis de proteína C reativa (PCR) antes e após o tratamento com terapia biológica (anticorpos anti-TNF- $\alpha$ )
- Correlacionar a resposta clínica com a permeabilidade intestinal e a calprotectina fecal no grupo de pacientes tratados com terapia biológica (anticorpos anti-TNF- $\alpha$ ) e demais marcadores inflamatórios

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 INTRODUÇÃO

A DC caracteriza-se por inflamação intestinal crônica, de etiologia parcialmente conhecida, que pode acometer qualquer segmento do trato digestivo, da boca ao ânus. Apresenta distribuição caracteristicamente segmentar e manifesta-se, frequentemente por dor abdominal, diarreia e perda de peso. Pode evoluir com complicações, como fístulas, abscessos e obstrução intestinal. Apresenta tendência a recorrências durante toda a vida, mesmo após ressecção cirúrgica. Pode estar associada a diversas manifestações extra-intestinais. O tratamento atualmente disponível possibilita o controle da atividade da doença e o alívio dos sintomas, mas não proporciona a cura. Sua definição e diagnóstico baseiam-se nas manifestações clínicas e nos achados bioquímicos, radiológicos, endoscópicos e histológicos. Entretanto, nenhuma das alterações é considerada patognomônica da doença.<sup>3</sup>

A DC acomete com maior frequência adultos jovens, em seu período mais produtivo, ocasionando enorme diminuição na qualidade de vida. Cerca de 70% dos pacientes necessitam de tratamento cirúrgico e 30% sofrem repetidas ressecções intestinais.<sup>3</sup>

Altas taxas de incidência são descritas nos Estados Unidos da América, Escandinávia e Grã-Bretanha. A Ásia, África e América do Sul são consideradas áreas de baixa incidência. Entretanto, nos últimos anos, um aumento tem sido observado nestas áreas, o que parece ter relação direta com o desenvolvimento e a urbanização destes grupos populacionais.

Nos Estados Unidos, a incidência da DC apresentou aumento entre os anos de 1935 e 1975. Levantamento realizado entre os anos de 1990 e 2000, em uma mesma população, demonstrou incidência de 7,9 por 100.000 pessoas/ano. Na Europa, mudança epidemiológica das DII tem sido observada ao longo das últimas décadas. O leste europeu que, historicamente, possuía baixas taxas de incidência de DII, apresentou aumento entre os anos de 1977-2001, a exemplo da Hungria, que apresentou elevação da incidência de 0,4 para 4,7 por 100.000 pessoa/ano. Os Países asiáticos apresentam baixas taxas de incidência quando comparados aos países ocidentais. Estudos realizados entre os anos de 1998 e 2005 demonstraram taxas que variaram de 1,00 a 1,34 por 100.000 pessoas/ano no entre Japão, Coreia do Sul e Hong-Kong. Dados relativos às Américas Central e do Sul ainda são escassos. Estudo pioneiro realizado no Brasil, entre 1986 e 2005, que teve como objetivo estimar a prevalência de DII no estado de

São Paulo, demonstrou aumento desta de 0,4 por 100.000 pessoas/ano para 3,5 por 100.000 pessoas/ano para DC.<sup>8;9;21</sup>

A urbanização parece constituir importante fator de risco para o desenvolvimento da DC, assim como a ocidentalização do estilo de vida, aspectos esses que poderiam explicar a tendência ao aumento das taxas de incidência da doença. A análise de populações migrantes sugere que as diferenças na prevalência observada entre os diversos grupos étnicos e raciais estariam mais relacionadas ao estilo de vida e às influências ambientais do que as diferenças genéticas propriamente ditas.<sup>9;10</sup>

A apresentação clínica da DC varia, dependendo do local de acometimento, da extensão, da gravidade, do comportamento da doença, da presença de complicações e manifestações extra-intestinais. O conhecimento dos diferentes fenótipos auxilia a compreensão dos diversos quadros clínicos possíveis. São reconhecidos três fenótipos, caracterizados pelo padrão penetrante, estenosante e não estenosante e não penetrante, os quais podem se apresentar de forma isolada ou associada. No Congresso Mundial de Gastroenterologia, realizado em Montreal no Canadá, em 2005, foi apresentada uma proposta de classificação que aborda as características clínicas baseada na localização, idade ao diagnóstico e comportamento da DC (Quadro 1).<sup>22</sup> A utilização dessa classificação trouxe uma linguagem mundial comum no que se refere aos diferentes perfis clínicos da doença, além de ressaltar o aspecto evolutivo e dinâmico dessa afecção. Constata-se que a maioria dos pacientes que, ao diagnóstico, apresentava padrão não penetrante e não estenosante, ao longo do tempo evolui para complicações como fístula e estenose o que ocorre em 50% a 60% dos casos, após 10 anos de evolução da doença.<sup>4</sup>

A doença apresenta predileção pelo intestino delgado distal e intestino grosso proximal. Cerca de metade dos pacientes têm doença que acomete tanto o íleo quanto o cólon. Em aproximadamente um terço dos pacientes, o acometimento é do intestino delgado, principalmente íleo e, em alguns casos, o jejuno. Cerca de 20% a 25% dos casos apresentam unicamente lesão colônica. O envolvimento isolado do jejuno é raro, assim como o de esôfago, estômago e duodeno.<sup>4</sup>

**Quadro 1: Classificação de Montreal (Silverberg et al, 2005)<sup>22</sup>**

Idade ao diagnóstico (A)	A1: 16 anos ou menos A2: 17 - 40 anos A3: > 40 anos	
Localização (L)	L1: íleo terminal L2: cólon L3: íleocólon L4: trato GI superior	L1 + L4: íleo + TGI superior L2 + L4: cólon + TGI superior L3 + L4: íleocólon + TGI superior
Comportamento (B)	B1: não estenosante, não penetrante B2: estenosante B3penetrante	B1p: não estenosante, não penetrante + fístula perianal B2p: estenosante + fístula perianal B3p: penetrante + fístula perianal

TGI: Trato gastrointestinal superior

Dor abdominal e diarreia são sintomas mais frequentes. A dor geralmente é tipo cólica, mas pode ser persistente e forte. Perda de peso, astenia, febre baixa e retardo do desenvolvimento somático e sexual nas crianças e adolescentes, são sintomas constitucionais que podem estar presentes ou se constituírem na única manifestação da afecção.<sup>4</sup>

As manifestações perianais, que se caracterizam principalmente por lesões de pele, fissuras, fístulas, abscessos e estenose anorretal são observadas com frequência no curso evolutivo da DC.<sup>4</sup>

A DC é sede de complicações, muitas vezes variadas, como a perfuração intestinal, abscessos e fístulas abdominais, estenose e obstrução e doença perianal.<sup>4</sup>

A estenose da luz intestinal pode ser determinada por inflamação quando a doença está em atividade ou por fibrose constituindo-se em processo cicatricial. A primeira, decorrente do processo inflamatório, responde ao tratamento clínico. Já a segunda, de natureza fibrótica, pode requerer dilatação por endoscopia ou intervenção cirúrgica para desfazer a obstrução.<sup>4</sup>

As fístulas, que são comunicações anormais entre dois órgãos, podem ocorrer durante o curso evolutivo da DC. As mais comuns são as fístulas perianais, que surgem em 15% a 35%

dos pacientes. Fístulas de um segmento do trato gastrointestinal para o outro, como a ênteroentérica, ênterocolônica ou colóncolônica, ocorrem com frequência e geralmente são assintomáticas. As fístulas para o trato urinário ou vagina não são raras e podem provocar pneumatúria, fecalúria ou expulsão de ar pela vagina. Essa condição determina infecção urinária ou ginecológica.

Além das complicações estenosantes e penetrantes, várias outras podem ocorrer distantes do intestino. Estima-se que um quarto dos pacientes com DC terão uma manifestação extra-intestinal e que um quarto dos acometidos podem desenvolver mais de uma manifestação clínica, haja vista que a doença tem caráter sistêmico. As mais comuns são artrite, espondilite anquilosante, pioderma gangrenoso, eritema nodoso, irite, uveíte, episclerite e colangite esclerosante primária. Algumas manifestações podem anteceder o diagnóstico da doença.<sup>4</sup>

O tratamento farmacológico da DC possui diversas ferramentas terapêuticas. Embora a eficácia dos corticosteroides na DC em atividade seja incontestável, o uso dessa classe de medicamentos é contraindicada no tratamento de manutenção de remissão, além da sua utilização em longo prazo estar associada a efeitos adversos, como insônia, labilidade emocional, psicose, osteoporose, miopatia, catarata, diabetes, hipertensão, glaucoma e pancreatite aguda.

14

Entre os derivados salicílicos, se incluem a sulfassalazina e a mesalazina. A primeira é desdobrada por ação bacteriana no cólon, em sulfapiridina e ácido 5-aminisalicílico (5-ASA ou mesalazina). A mesalazina é o metabólito ativo e age na mucosa intestinal. Embora vários ensaios clínicos tenham demonstrado a eficácia do 5-ASA em induzir e manter a remissão em pacientes com RCU de leve e moderada atividade, faltam evidências para sua utilização na DC. Bergman e Parks<sup>23</sup> realizaram revisão sistemática da literatura, com a inclusão de seis ensaios clínicos controlados e randomizados, que não demonstraram melhora significativa das taxas de remissão em pacientes com DC em uso de 5-ASA, quando comparados ao placebo. Apesar da falta de evidências a respeito da utilização desses medicamentos, estimou-se em 2003, que 75% dos gastroenterologistas continuavam usando a 5-ASA como tratamento de primeira escolha para pacientes com DC leve à moderada.<sup>16</sup>

Dentre os mecanismos envolvidos na patogênese da DC, a disfunção imunológica associada a intolerância à microbiota normal aparenta ter grande relevância. Algumas bactérias já foram investigadas no desenvolvimento da DC, tais como a *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis*, e *Escherichia coli*.

Estudos têm sugerido que os antibióticos podem ser eficazes no tratamento de pacientes com atividade inflamatória, complicações perianais e recidivas pós-operatórias.<sup>24</sup>

Na classe dos imunossuppressores ou imunomoduladores podem ser citadas as tiopurinas, azatioprina (AZA) e 6-mercaptopurina (6-MP), a cloroquina, a ciclosporina e o metotrexato. Mais recentemente, o tacrolimus e o micofenato mofetil têm sido utilizados. Os imunomoduladores mais estudados e utilizados na DII e com os quais há considerável experiência acumulada são a AZA e a 6-MP. Estudo de meta-análise realizado pela Rede Cochrane no ano de 2010, que incluiu oito ensaios clínicos, teve como objetivo avaliar a eficácia da AZA e 6-MP no tratamento da DC. Os resultados demonstraram alta taxa de resposta em pacientes tratados com as tiopurinas, quando comparados ao grupo placebo. Demonstraram também que o período mínimo para alcance da resposta terapêutica é superior a 17 semanas de tratamento. As tiopurinas constituem medicamentos de grande relevância para tratamento de manutenção, na abordagem da dependência e resistência aos corticoides, bem como mostraram-se úteis na DC penetrante. Nikfar et al<sup>25</sup> demonstraram em meta-análise, que incluiu 11 ensaios controlados por placebo, redução significativa de pelo menos 50% do número de fístulas ativas após uso de associação de imunossuppressores e antibióticos.<sup>10; 14</sup>

Apesar das tiopurinas serem amplamente utilizadas no manejo da DC e da RCU, aproximadamente 20% dos pacientes desenvolvem algum tipo de intolerância a esses medicamentos e outros 30% mostram-se refratários. Como alternativa, nesses casos, recomenda-se o uso do metotrexato. Ensaio clínico controlado por placebo demonstrou, após 16 semanas de administração semanal de 25mg de metotrexato por via intramuscular, remissão em 39% dos pacientes do grupo tratado, em comparação a 19% do grupo placebo. Efeitos adversos como náusea, diarreia, estomatite, leucopenia, alopecia, elevação de transaminases, pneumonia por hipersensibilidade, fibrose ou cirrose hepática foram descritos em 10 a 25% dos pacientes que usaram metotrexato. A administração concomitante do ácido fólico tende a minimizar o aparecimento dos efeitos adversos.<sup>16</sup>

O objetivo do tratamento da DC não se constitui somente em induzir e manter a remissão clínica mas, principalmente cicatrizar a mucosa inflamada. Beppu *et al*<sup>17</sup>. demonstraram que 79,1% dos pacientes com acometimento ileal e 78,9% daqueles com acometimento colônico que atingiram a cicatrização das lesões apresentaram também, remissão clínica. A cicatrização da mucosa é considerada como fator preditivo do prognóstico em longo prazo e quando



alcançada, resulta na diminuição do uso de esteroides, do número de recidivas, de internações hospitalares e intervenções cirúrgicas.<sup>17</sup>

A terapia biológica mostra-se capaz de cicatrizar a mucosa intestinal inflamada e tem nos anticorpos contra o Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (anti-TNF- $\alpha$ ) seu principal representante no tratamento da DC. O Fator de Necrose Tumoral –  $\alpha$ , citocina pró-inflamatória, tem papel central na patogênese das DC e, por isso, a terapia biológica se tornou importante alternativa do arsenal terapêutico no tratamento das DII. Todavia, o mecanismo preciso de ação dos anticorpos anti-TNF não foi totalmente identificado e provavelmente compreende mais que a simples neutralização do TNF solúvel. Um grande número de estudos tem relacionado citocinas pró-inflamatórias, como o Interferon e o Fator de Necrose Tumoral, ao aumento da permeabilidade paracelular e, dessa maneira, a recomposição da barreira intestinal seria um mecanismo que explicaria a eficácia dos anti-TNF. Essa hipótese é corroborada pela habilidade do iInfliximabe, o primeiro representante da classe, em restaurar a função de barreira em pacientes com DC. Os dois principais anti-TNF usados atualmente para tratar a DII são o Infliximabe e o Adalimumabe. O primeiro é um anticorpo quimérico monoclonal, sendo indicado com o objetivo de: 1) induzir melhora ou remissão clínica; 2) reduzir o número de fístulas drenantes perianais ou enterocutâneas ou eliminá-las em totalidade; 3) poupar o uso de esteróides; ou 4) evitar completamente o uso de esteróides, empregando o infliximabe como um rápido agente de indução, seguido por tratamento de manutenção conjugado com a azatioprina, 6-mercaptopurina ou metotrexato. O segundo é um anticorpo totalmente humano, monoclonal e recombinante do tipo IgG1 e, além de ser indicados nas mesmas situações supracitadas, pode ser usado quando há falha terapêutica no uso do infliximabe. Outros medicamentos que se enquadram na classe de biológicos são o certalizumabe pegol e o natalizumabe.<sup>18</sup>

Não existe um exame considerado padrão para o diagnóstico da DC. A história clínica do paciente, o exame físico bem conduzido, os exames de imagem, além do histopatológico, conduzem ao diagnóstico dessa afecção intestinal e orientam, muitas vezes, na realização dos demais exames. Assim, alguns procedimentos podem trazer informações importantes que conduzem a condição da suspeita clínica. Marcadores bioquímicos tem sido utilizados por diversas razões, já que permitem a mensuração objetiva da atividade da doença e evitam ou diminuem o emprego de métodos invasivos, tais como a colonoscopia. Considerando as características ideais que um marcador deve possuir, como rapidez e facilidade de mensuração, reprodutibilidade entre pacientes e laboratórios, possibilidade de detectar atividade da doença,

avaliar os efeitos do tratamento, entre outros, destacam-se três marcadores: proteína-C reativa, velocidade de hemossedimentação e calprotectina fecal<sup>19; 20</sup>

A DII pode ser categorizada por meio de diversos índices de classificação e avaliação da atividade. Os índices e sistemas de classificação são as principais ferramentas que permitem a formação de uma base para pareamento e análise de dados. Em 2005, no Congresso Mundial de Gastroenterologia, o sistema de classificação de Viena proposto em 1998 foi atualizado, tendo em vista que esse sistema possibilitava a estratificação da DC em apenas 24 subgrupos. A classificação de Montreal (Quadro 1) não substituiu os três principais parâmetros utilizados (idade ao diagnóstico, localização da doença e comportamento), mas incluiu modificações em cada um deles, principalmente no que diz respeito à ocorrência de doença perianal, independente do acometimento intestinal.<sup>26</sup>

O Índice de atividade da doença de Crohn (CAI) foi desenvolvido a partir da observação inicial de 18 variáveis. Após análise multivariada, a fim de desenvolver um índice que melhor predissesse a impressão geral do investigador para cada paciente, oito variáveis foram escolhidas para o cálculo do CAI. Esse sistema de classificação possui algumas limitações, principalmente relacionadas ao caráter subjetivo de algumas das variáveis, e que possuem pesos relevantes no valor final do escore.<sup>27</sup>

## 3.2 ETIOPATOGENIA

Ao longo dos anos, várias teorias foram propostas para explicar a etiopatogenia da DC, desde causas infecciosas, psicossomáticas, metabólicas, vasculares, genéticas, alérgicas, autoimunes e imunomediadas. Com o passar do tempo, algumas foram abandonadas, enquanto outras ganharam maior importância, em especial aquelas que incluíam fatores ambientais, genéticos, relativos à microbiota intestinal e a resposta imune. Estes quatro fatores têm sido apontados como pilares da etiopatogenia da DC, embora nenhum deles possa, isoladamente, desencadear o processo inflamatório crônico. A integração e a influência destes, provavelmente, são imprescindíveis para o surgimento e determinação dos diferentes fenótipos das DC.

### 3.2.1 Fatores ambientais

A distribuição geográfica da DC e as mudanças em curso na incidência dessa doença indicam que fatores ambientais desempenham importante papel na sua etiologia. A susceptibilidade genética é condição primordial para o desenvolvimento das DC e, tendo em

vista que as mudanças genéticas ocorrem de forma lenta e gradual, é natural que o rápido aumento da incidência sugira que os fatores ambientais são tão relevantes quanto os genéticos no desenvolvimento das DC.<sup>28</sup>

É indiscutível que o surgimento da DC em várias regiões do mundo está associado à melhoria das condições socioeconômicas, como observado inicialmente no norte da Europa e nos Estados Unidos da América. Posteriormente, no restante do continente europeu, América do Sul, Japão e mais recentemente na região do Pacífico Asiático. A "hipótese da higiene", proposta inicialmente em 1989 por Strachan *et al*<sup>29</sup>, ainda permanece como importante teoria para explicar o rápido aumento da incidência e prevalência mundiais da DC. Essa hipótese postula que seu aumento deve-se à mudança drástica e rápida de um estilo de vida "sujo", com alta exposição a agentes microbianos e parasitários, para um estilo de vida "limpo", com baixa exposição a esses fatores. Tal mudança seria consequência do acesso a água e alimentos mais seguros, ampliação do acesso aos antibióticos, vacinas e ausência de contato com agentes bacterianos e parasitários, resultantes de melhorias da higiene e saneamento das populações. A teoria propõe ainda que o declínio progressivo de doenças infecciosas nas fases iniciais da vida compromete o desenvolvimento do sistema imunológico, tornando-o e menos apto para lidar com novos estímulos, sendo incapaz de eliminar agentes agressores ou respondendo de modo inadequado à microbiota normal do paciente.<sup>30</sup>

Um grande número de fatores ambientais são considerados fatores de risco para o desenvolvimento da DC, incluindo o tabagismo, dieta, medicamentos (contraceptivos orais e anti-inflamatórios não esteroidais), estresse, microbiota entérica, permeabilidade intestinal alterada e apendicectomia. Desses, o tabagismo representa o fator ambiental mais fortemente associado ao risco de desenvolvimento das DII, possuindo caráter protetor para RCU, e aumento do risco para DC. Fumantes com DC, quando comparados a não fumantes, apresentam pior curso evolutivo da doença, elevadas taxas de recidivas, intervenções cirúrgicas mais frequentes e maior necessidade de medicamentos imunossupressores. O efeito do tabaco sobre a DC pode estar associado à modulação da resposta imune, à alterações nos níveis de citocinas, mudanças na composição do muco intestinal, efeitos vasculares e alterações da permeabilidade intestinal, dentre outros.<sup>30; 31</sup>

### 3.2.2 Fatores genéticos

Estudos epidemiológicos e familiares demonstraram que fatores genéticos desempenham um importante papel na susceptibilidade à DC. Existe um aumento na

prevalência das DII em parentes de primeiro e segundo grau, além de um aumento do risco relativo entre irmãos. Observa-se elevada taxa de concordância em gêmeos monozigóticos versus dizigóticos, na ocorrência da DC. No caso de gêmeos monozigóticos, a taxa de concordância varia de 37% a 58%, enquanto que para gêmeos dizigóticos as taxas situam-se entre 3,9 a 12%.<sup>31</sup>

Esta afecção, no entanto, é geneticamente complexa e não pode ser explicada por modelo de um único gene. A DC é considerada um distúrbio poligênico heterogêneo. Após a descoberta da associação de variantes do gene NOD2/CARD15 com a DC ileal e de variantes do gene do receptor para IL-23 com a DC e RCU, o número de associações genéticas para as DII vêm aumentando exponencialmente. A NOD2 é uma proteína citosólica responsável pelo reconhecimento do dipeptídeo muramil bacteriano, o principal componente da parede desses microrganismos. O gene NOD2 é expresso principalmente em monócitos e macrófagos, nos quais desempenha o papel na sinalização de vias, sendo um de seus efeitos, a ativação do Fator Nuclear (NF)- $\kappa$ B, envolvido na resposta inflamatória celular e na apoptose de macrófagos. A ativação do NF-  $\kappa$ B desencadeia a produção de uma gama de mediadores inflamatórios não específicos, incluindo citocinas, fatores de crescimento, metabólitos do ácido araquidônico e espécies reativas de oxigênio, que favorecem o processo inflamatório e, em última instância, levam à destruição tecidual. Mutações no gene NOD2, paradoxalmente, reduzem a ativação macrofágica de NF-  $\kappa$ B. Consequentemente, esperar-se-ia uma diminuição dos processos inflamatórios, ao contrário do aumento observado nas DII. A justificativa para tal observação permanece desconhecida.<sup>31; 32</sup>

Estudos de Associação Genômica Ampla (GWAS) já permitiram a identificação de 163 *loci* independentes associados às DII, sendo 92 já bem consolidados e 71 recém-descobertos. Desse total, a maior parte dos *loci* (67%) estão associados tanto com a DC quanto com a RCU. Apenas 38 *loci* determinam fenótipos específicos para a DC. Deve-se notar que a maior parte das associações genéticas relatadas não determina alteração isolada em via pró-inflamatória específica, mas apontam para os *loci* que possuem múltiplos genes provavelmente envolvidos na etiologia das DII.<sup>32</sup>

Além da identificação das vias pró-inflamatórias, o estudo das anormalidades genéticas na DC tem o potencial de fornecer informações relevantes ao manejo clínico da doença. Na visão de Schirbele e Fiochi<sup>33</sup> a análise genética combinada poderá auxiliar na distinção entre

DC e RCU e prever o risco e gravidade da DC, bem como prever a resposta ao tratamento com a terapia biológica em pacientes com RCU.<sup>33</sup>

### 3.2.3 Fatores microbianos

A teoria de que o desenvolvimento da DC seria a consequência da perda de tolerância imunológica à microbiota intestinal autóloga permanece válida. Grande número de estudos em modelos animais de DII e, em menor número, estudos em humanos, corroboram essa teoria. Na maioria dos modelos animais, a presença de bactérias no intestino é essencial para o desenvolvimento da DII experimental. É amplamente aceito o fato de que a microbiota comensal de indivíduos saudáveis, particularmente a microbiota colônica, apresenta extensa variabilidade, porém, o uso de variados métodos baseados em análise de DNA e de cultura apresentam resultados que não são comparáveis entre si. Consequentemente, torna-se difícil determinar se a microbiota comensal apresenta-se normal ou alterada nas DII.<sup>30</sup>

Em indivíduos com DC, a existência de reatividade imunológica direcionada a microrganismos intestinais já é conhecida há bastante tempo, sendo demonstrada pela presença de anticorpos sorológicos contra uma variedade de microrganismos, incluindo anti *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA), antimembrana externa da proteína C, antinflagelina CBir1 e anti-I2. Esses anticorpos são frequentemente usados como biomarcadores para a DC e a detecção de altos títulos desses anticorpos está associada à ocorrência de complicações e ao rápido progresso do curso da doença. Esses achados estabelecem uma conexão próxima entre a magnitude da resposta imune contra a microbiota intestinal e a patogênese da DC.<sup>33</sup>

Se, de fato, a resposta imune contra a microbiota intestinal é o pilar central da patogênese das DC, uma questão que permanece sem esclarecimento relaciona-se ao direcionamento da resposta imunológica, se esta é dirigida para a flora como um todo, para subgrupos específicos de microrganismos ou para cepas específicas.<sup>33</sup>

O desenvolvimento de reatividade imunológica às bactérias entéricas é fenômeno fisiológico, que se inicia imediatamente após ao nascimento, quando o intestino começa a ser exposto a uma série de antígenos microbianos. O organismo desenvolve uma condição de tolerância contra esses antígenos, a fim de se evitar respostas exacerbadas ou nocivas. O que se observa na DC é a perda desse estado de tolerância e a instalação de resposta inflamatória local não controlada, que se traduz nas manifestações clínicas da doença.<sup>33</sup>

A falta de conhecimento a respeito da composição da microbiota intestinal normal, constitui um dos maiores obstáculos à compreensão da maneira como ocorre e o motivo da perda do estado de tolerância. A quantidade de bactérias associadas com a camada mucosa é acentuadamente aumentada em pacientes com DII, mas sua composição qualitativa permanece ainda pouco elucidada.<sup>33</sup>

Outro aspecto relevante da maneira como o hospedeiro modula a resposta às alterações bacterianas, refere-se ao papel dos peptídeos antimicrobianos produzidos espontaneamente, como as defensinas. Alfa-defensinas entéricas, produzidas no intestino delgado de mamíferos, pelas células de Paneth, são responsáveis pela defesa contra patógenos e pelo controle do equilíbrio entre as diversas populações bacterianas, além de manter a homeostase local. No entanto, anormalidades na produção ou na função das defensinas podem interferir na composição da flora intestinal e contribuir para o desenvolvimento da DC. Estudos demonstraram que a síntese de  $\alpha$ -defensinas está reduzida na DC ileal, além de redução da atividade antimicrobiana na DC colônica, achado consistente com a redução da expressão desse peptídeo.<sup>33</sup>

#### 3.2.4 Fatores imunológicos

A resposta imunológica é considerada o braço efetor da inflamação. A melhor compreensão do seu funcionamento e das alterações que ocorrem na DC são fundamentais para elucidar os mecanismos envolvidos na inflamação crônica da mucosa intestinal. Ao se avaliar as características da imunidade inata, em condições normais, sabe-se que os macrófagos estão condicionados à expressão de um fenótipo não inflamatório, com produção limitada de citocinas pró-inflamatórias. A mucosa intestinal de pacientes com DC exhibe macrófagos ativados, heterogêneos, em maior número e que produzem mais citocinas pró-inflamatórias, como a IL-3 e TNF- $\alpha$ . Estas citocinas, além de participarem diretamente do processo inflamatório, também influenciam a produção de IFN- $\gamma$ , pelos linfócitos T locais. Outro aspecto relevante relacionado à imunidade inata refere-se às células dendríticas intestinais, que são células apresentadoras de antígenos e que participam da regulação da resposta imunológica local. Elas são responsáveis tanto pela proteção e defesa da mucosa, como também, por induzir tolerância e mediar a inflamação. Na DC, estas células estão ativadas, o que resulta no aumento da expressão dos receptores microbianos, além da produção em níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como IL-2 e IL-6.<sup>33</sup>

Em relação à imunidade adaptativa, a produção de anticorpos pelos linfócitos B está aumentada na DC. Observam-se alterações na síntese e secreção de IgM, IgG e IgA, tanto nas células sanguíneas periféricas quanto nas células da mucosa intestinal acometida. Por muitos anos, atribuiu-se às células T, especialmente, às células TCD4+ o papel central na patogênese da DII. O estudo dessas células produziu informações cruciais sobre a imunidade celular, tanto na DC quanto na RCU, além de ajudar a definir padrões distintos da função imunorregulatória e os perfis de secreção diferentes dessas citocinas para as duas entidades. As evidências atuais demonstram o importante papel das respostas Th1 e Th17 na DC, com produção elevada de citocinas pró-inflamatórias como o INF- $\gamma$ , IL-12, IL-17 e IL-21, dentre outras.

### 3.3 BARREIRA INTESTINAL

A mucosa intestinal é uma das maiores áreas da superfície corporal que está em contato com o meio externo, permitindo desta forma a interação entre os dois ambientes. A mucosa intestinal tem a capacidade de manter o equilíbrio entre a absorção dos nutrientes essenciais, enquanto previne a entrada de agentes nocivos. Esta superfície epitelial compõe o arcabouço da função de barreira da mucosa intestinal. Ainda que, o epitélio intestinal constitua a barreira física entre o ambiente externo e interno, a barreira mucosa intestinal é formada por outros elementos como a camada de muco, elementos da resposta imune inata e adaptativa e a motilidade intestinal.<sup>11</sup>

A microbiota comensal pode ser considerada um dos componentes da barreira mucosa. Contribui não somente para a absorção de determinados nutrientes, mas também evita a colonização intestinal por patógenos, por meio da produção de substâncias antimicrobianas, da alteração do pH luminal e por competição direta com os microrganismos nocivos. Além disso, a microbiota comensal induz a angiogênese e o desenvolvimento do epitélio intestinal.<sup>11</sup>

Admite-se que, aproximadamente, 100 trilhões de células bacterianas colonizem o intestino humano, fato que reforça a importância da manutenção da função de barreira da mucosa intestinal. Outro importante componente dessa barreira é a fina camada de muco, produzido pelas células caliciformes, a qual recobre todo o epitélio intestinal. Enquanto a maior parte dos microrganismos do lúmen podem ser encontrados na porção externa da camada de muco, há uma região mais interna, adjacente à superfície epitelial, que permanece relativamente estéril. A esterilidade dessa região decorre da retenção e concentração de proteínas antimicrobianas produzidas por enterócitos e células de Paneth. O papel crucial da camada de muco na manutenção da barreira intestinal já foi evidenciado em experimentos com

camundongos nocaute para MUC2, nos quais bactérias em contato direto com o epitélio intestinal, desencadearam resposta inflamatória intestinal exacerbada. No entanto, observa-se que mutações no gene MUC2 não têm sido associadas a defeitos na barreira mucosa de humanos.<sup>11</sup>

A imunoglobulina A é fator essencial na sustentação da compartimentalização das bactérias luminais e na limitação da penetração desses microrganismos no hospedeiro. Associada ao papel antimicrobiano das substâncias presentes na porção interna da camada de muco, a secreção de imunoglobulina A contribui para o sequestro das bactérias no muco intestinal, mantendo-as afastadas do epitélio. A deficiência de IgA pode levar à ruptura da barreira intestinal por aumento da penetração de bactérias comensais.<sup>34</sup> O epitélio é o principal elemento integrante da barreira mucosa intestinal. As células epiteliais estão conectadas por uma série de complexos juncionais dinâmicos, compostos pelas junções firmes e pelas junções aderentes, formando uma monocamada contínua e polarizada. As junções aderentes são formadas principalmente pelas caderinas, uma família de proteínas transmembrana que são responsáveis por fortes interações entre moléculas das células adjacentes. As junções firmes são complexos multiproteicos compostos por proteínas transmembrana, proteínas periféricas de membrana e moléculas reguladoras, como as quinases. As proteínas transmembrana mais importantes são os membros da família das claudinas, responsáveis por vários aspectos da permeabilidade das junções firmes. Proteínas periféricas de membrana, tais como a Proteína da Zônula de Oclusão 1 (ZO1) e a Proteína da Zônula de Oclusão 2 (ZO2), são cruciais para a formação e manutenção das junções firmes, desde que incluem vários domínios de interação com outras proteínas, como as claudinas, ocludinas e actina. As junções firmes limitam o fluxo de soluto através da via paracelular, que é tipicamente mais permeável que a via transcelular. Dessa forma, as junções firmes são responsáveis pela limitação da velocidade de transporte transepitelial, além de se constituírem no principal agente determinante da permeabilidade da mucosa.<sup>34</sup>

A capacidade de citocinas, como o TNF- $\alpha$  e o INF- $\gamma$ , em regular a função de barreira das junções firmes, já foi descrita. O aumento da transcrição de proteínas das junções firmes, a remoção através de vesículas e a degradação dessas proteínas, a ativação por quinases, além da modulação pelo citoesqueleto, têm sido propostos como mecanismos dos danos induzidos pelas citocinas à função de barreira das junções firmes. Embora a apoptose excessiva de células epiteliais possa causar prejuízo à barreira intestinal, a relevância da apoptose de uma única célula, para promover disfunção de barreira, permanece controversa.<sup>34</sup> Sabe-se que a produção



de TNF- $\alpha$  está aumentada em pacientes com DC, quando comparados a indivíduos saudáveis.<sup>35</sup> Estudos com modelos *in vitro* do epitélio, utilizando células do tipo HT-29/B6, demonstraram que o TNF- $\alpha$  promove redução na função de barreira do epitélio através da indução de apoptose celular e por atuar nas junções firmes. Esta citocina provoca diminuição dos feixes que compõem esse tipo de junções, fato observado por meio de microscopia eletrônica por criofratura, além de também atuar reduzindo a expressão de proteínas constituintes das junções firmes.<sup>36</sup>

Zeissig *et al*<sup>36</sup> encontraram altas taxas de apoptose celular em pacientes com DC, quando comparado aos controles. Após terapia com anticorpo anti-TNF- $\alpha$ , houve queda expressiva da taxa apoptótica entre os indivíduos com DC, porém, os valores ainda se encontravam acima da faixa considerada normal. Entretanto, duas semanas após à terapia 91% dos pacientes alcançaram taxas normais de apoptose.<sup>36</sup>

Células pluripotentes, encontradas nas regiões das criptas intestinais, dão origem à diversos tipos celulares, tais como enterócitos, células caliciformes, células enteroendócrinas e células de Paneth. Os enterócitos têm, primariamente, função absorptiva. Possuem extensa rede de microvilosidades em sua superfície apical, que contém uma variedade de enzimas digestivas e transportadores, essenciais ao metabolismo e absorção de antígenos provenientes da dieta. Os enterócitos também desenvolveram um complexo mecanismo de transporte, elucidado pelas vias de permeação, de sorte que esse mecanismo garante uma barreira efetiva à penetração de macromoléculas e microrganismos danosos. Além de formar uma barreira física, as células epiteliais mantêm um sistema de defesa da mucosa por meio da expressão de vasta rede de Receptores Reconhedores de Padrões (PRRs), tais como os receptores Toll-like e as Proteínas com Domínio de Ligação a Nucleotídeos e Oligomerização (NOD). Esses receptores compõem o arcabouço da resposta imune inata, por meio da rápida resposta e reconhecimento dos componentes microbianos. Em geral, a detecção de bactérias ou de seus componentes resulta da ativação desses receptores, iniciando uma cascata de eventos que ativam moléculas sinalizadoras, como o fator nuclear-kB, resultando na expressão de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e peptídeos antimicrobianos. O resultado é a erradicação dos possíveis microrganismos invasores. Contudo, sinais anômalos para os PRRs, mediados por bactérias comensais, podem levar à estimulação de resposta inflamatória diversas, que resultam em inflamação crônica.<sup>11</sup>

A enorme população bacteriana e sua proximidade com os receptores PRRs, evidencia o paradoxo de como o epitélio consegue evitar a ativação contínua da resposta inflamatória pela microbiota residente. O intestino permanece em um constante estado inflamatório de baixa magnitude, denominado "inflamação fisiológica", que tem sido indicado como parte da função de barreira da mucosa intestinal. As células epiteliais, especialmente as células de Paneth, são capazes de detectar células bacterianas e liberar uma série de peptídeos antimicrobianos, constituindo um feedback negativo que limita o acesso bacteriano e a penetração da superfície do epitélio intestinal. Camundongos com deficiência de células de Paneth demonstram aumento da translocação bacteriana para os tecidos, o que ilustra a capacidade das células epiteliais em monitorar a população bacteriana. Desse modo, uma resposta antimicrobiana dependente de densidade é ativada, o que permite às células epiteliais um controle direto da quantidade de células bacterianas associada à superfície epitelial, sem o extermínio da microbiota luminal, crucial para a saúde do hospedeiro.<sup>11</sup>

### 3.4 PERMEABILIDADE INTESTINAL

O epitélio intestinal possui diferentes propriedades, promovendo tanto a função de barreira, quanto a função de transporte de substâncias presentes na luz intestinal. A função de barreira caracteriza-se pelo grau de facilidade da passagem de moléculas através da parede intestinal, por meio de mecanismo de difusão não mediada. Tal mecanismo depende do gradiente de concentração ou de pressão e ocorre sem o auxílio de sistemas carreadores, ativos ou passivos. A permeabilidade intestinal relaciona-se à função de barreira exercida pelo epitélio intestinal e traduz-se pela permeação de moléculas com peso molecular maior que 150 Da. É importante destacar a diferença entre os processos de permeação e absorção, já que o último ocorre por mecanismo mediado por carreador e está relacionado à função nutricional do intestino<sup>37; 38</sup>

A barreira intestinal exhibe comportamento dinâmico, pois se altera sob estresse hiperosmolar, além de ser influenciada por doenças, fármacos, dieta, citocinas, hormônios e fatores ambientais. A consequência do comprometimento da função de barreira para o acesso de antígenos, os quais podem iniciar ou perpetuar respostas inflamatórias, e a possibilidade de realizar avaliações não invasivas de doenças e medidas terapêuticas, são alguns dos motivos do crescente interesse pelo estudo da permeabilidade intestinal.<sup>37</sup>

O interesse na utilização de marcadores para avaliar-se a passagem de substâncias através do intestino delgado não é recente, haja vista os trabalhos de Martin Lister e William

Musgave, no final do século 17 e início do século 18, respectivamente.<sup>13</sup> O estudo consistiu na introdução de leite misturado com índigo (massa molecular de 262 Da) diretamente no intestino delgado de cães, visando recuperar esse marcador na secreção das glândulas mamárias. No entanto, somente em 1965 a permeabilidade intestinal foi estudada em seres humanos. Disfunções da barreira intestinal nas doenças inflamatórias intestinais foram pioneiramente evidenciadas por Bjarnason *et al* em 1983, por meio do aumento na permeação do <sup>51</sup>Cr-EDTA.  
5; 13

A permeabilidade intestinal está aumentada na DC.<sup>15; 27; 34; 37; 38; 39; 40; 41; 42</sup> Testes com diferentes marcadores já foram realizados e comprovaram que os pacientes apresentam aumento da permeação das substâncias, quando comparados à indivíduos saudáveis, até mesmo quando a doença se apresenta em fase de remissão.

Duas rotas são descritas como possíveis vias para a permeação das substâncias através do epitélio intestinal íntegro: a transcelular e a paracelular. Na primeira, moléculas com menos de 0,4nm, como no caso do manitol e da L-ranose, atravessam as membranas celulares através de pequenos poros aquosos, de alta incidência, presentes na membrana dos enterócitos. Na segunda, a passagem das moléculas ocorre entre as células. Isto acontece com as moléculas com mais de 0,5nm, como a lactulose e o <sup>51</sup>Cr-EDTA, que penetram a mucosa intestinal por meio de canais aquosos maiores, de baixa incidência, presentes nas junções firmes.<sup>13</sup>

Existem várias razões para se acreditar que a via paracelular é a responsável pela passagem de substâncias com peso molecular maior que 180 Da, como a lactulose, a celobiose, o EDTA, a rafinose e o dextran. Estas moléculas apresentam distribuição exclusivamente extracelular após injeção venosa presumindo, assim, que não são capazes de atravessar as membranas celulares. As junções firmes representam uma interrupção natural à continuidade da membrana e tornam-se a potencial via de acesso dessas moléculas. As junções firmes localizadas entre as células das criptas são mais permeáveis do que a junções das células das vilosidades.<sup>13</sup>

Os monossacarídeos, tais como a L-ranose e os polímeros de polietilenoglicol (PEG) com pesos moleculares menores, são capazes de alcançar a mucosa intestinal através dos poros presentes nas membranas dos enterócitos. A natureza destes poros é desconhecida, mas acredita-se que sejam compostos por canais preenchidos por água e, possivelmente por proteínas. Em 1986, o trabalho conduzido por Maxton *et al*<sup>43</sup> sugeriu a existência de três vias distintas para a permeação das substâncias: paracelular, transcelular aquosa e transcelular

lipídica. Essa última seria utilizada por moléculas de PEG 400, que apesar de serem hidrossolúveis, possivelmente apresentam alguma afinidade por lípidos.

O tamanho e a forma das moléculas também podem influenciar as taxas de permeação. Nos seres humanos foi demonstrado que a massa molecular dos açúcares relaciona-se com as taxas de permeação. O PEG 400, em vista de possuir forma geométrica linear e menor peso molecular, apresenta maior taxa de permeação. Apesar do impacto da lipossolubilidade e da forma molecular do PEG 400 reforçar a teoria das três vias de permeação, alguns aspectos ainda não estão esclarecidos. O manitol apresenta altas taxas de permeação, com níveis inferiores somente ao PEG 400; no entanto, é utilizado por muitos fisiologistas como marcador de volume de fluidos extracelulares, ao contrário de outra molécula menor, a ranose, que apresenta peso molecular semelhante ao do manitol e é encontrada no interior dos enterócitos.

Outra alternativa para explicar a permeação das macro e micromoléculas foi sugerida por Hollander<sup>44</sup>. Nesta teoria, as junções firmes são responsáveis pela permeação de todas as substâncias e seu conceito é sustentado pela presença de uma resistência elétrica transepitelial. A evidência de que a taxa de permeação do manitol relaciona-se de maneira inversa à resistência elétrica transepitelial explica sua alta porcentagem de absorção pela via paracelular. Existe uma heterogeneidade morfológica entre as junções intercelulares no intestino delgado, segundo a qual o poder de selamento das mesmas é maior a medida que os enterócitos migram das criptas para as vilosidades.

A partir dessas considerações, torna-se evidente que não existe um consenso para explicar as vias de permeação. No entanto, fato é que a permeação às macromoléculas aumenta em processos que causam reação inflamatória na mucosa intestinal, favorecida por um afrouxamento que ocorre nas junções intercelulares, enquanto que a permeação dos monossacáridos e do PEG 400 retrata a área absorptiva da mucosa, isto é, a estrutura vilositária que compõe o epitélio intestinal.

### *3.4.1 Avaliação da Permeabilidade Intestinal*

A permeabilidade intestinal é obtida de maneira não invasiva, mediante a dosagem da excreção urinária de substâncias administradas em solução, por via oral. Inicialmente, substâncias como a lactulose e polímeros de polietilenoglicol, foram avaliadas individualmente, porém, os resultados foram influenciados por diversos fatores analíticos não relacionados à mucosa. Essa questão suscitou a utilização de taxas de excreção renal de diferentes substâncias,

originando um índice de permeabilidade intestinal, expresso como relação de excreção dos marcadores.<sup>38</sup>

Marcadores ideais de permeabilidade intestinal devem ser bioquimicamente inertes, além de atravessarem o epitélio intestinal por mecanismo de difusão não mediada. A dosagem realizada na urina é pertinente, tendo em vista que a concentração do biomarcador apresenta-se 100 vezes maior nessa amostra biológica do que no plasma, tornando a análise mais fácil e confiável. Um marcador adequado deve ser totalmente excretado pelo rim, além de não sofrer reabsorção tubular significativa. Embora o comprometimento da função renal altere a excreção da substância utilizada no teste, essa falha pode ser eliminada por meio do uso simultâneo de dois marcadores, que estarão sujeitos às mesmas variações, mantendo inalterada a sua relação de excreção.<sup>37</sup>

Outros fatores podem contribuir para a obtenção de resultados incorretos nos testes de permeabilidade intestinal, os quais estão relacionadas às variações individuais, tais como: esvaziamento gástrico, trânsito intestinal, diluição por secreções, *clearance* renal alterado. A coleta incompleta de urina também contribui para resultados inadequados. Todos esses fatores constituem fontes de erros inerentes aos testes realizados com marcadores únicos, que também podem ser eliminados por meio do uso simultâneo dos dois marcadores.<sup>37</sup>

Os testes utilizados para avaliação da permeabilidade intestinal podem ser divididos em três grupos, de acordo com a natureza do marcador: carboidratos, radioisótopos e PEG. Os testes que utilizam carboidratos têm sido os mais utilizados, principalmente aqueles que empregam simultaneamente dois marcadores, minimizando variações relativas a fatores externos à mucosa intestinal. A lactulose/manitol e a celobiose/manitol são as combinações mais documentadas. As soluções utilizadas nos testes devem ser isosmolares, tendo em vista que o estresse hiperosmolar pode aumentar a permeação das macromoléculas, alterando o resultado da permeabilidade intestinal. A excreção dos açúcares pode ser quantificada por meio de cromatografia líquida de alta performance, cromatografia líquido-gasosa ou ensaios enzimáticos.

Os radioisótopos são marcadores mais fáceis de serem dosados, quando comparados às demais substâncias utilizadas em testes de permeabilidade intestinal, porém possuem as desvantagens de um teste que utiliza marcador único, além de implicar na manipulação de radioatividade, o que requer cuidados especiais. O <sup>51</sup>Cr-EDTA é o mais utilizado pois é resistente à degradação bacteriana e pode fornecer informação sobre a permeabilidade colônica,

apesar de sua meia-vida ser relativamente curta (27 dias), o que limita o tempo ao qual as amostras de urina permanecem viáveis após a armazenagem.<sup>37</sup>

É possível avaliar a permeabilidade intestinal por meio da utilização do polímero de polietilenoglicol (PEG), encontrado sob diferentes formulações de acordo com o tamanho de suas partículas. O PEG 400 é o mais acessível, embora ainda haja algumas controvérsias a respeito da taxa de permeação dessa molécula em algumas condições, como na doença celíaca, na qual a taxa de permeação do PEG 400 está diminuída, ao contrário do que acontece com a relação lactulose/manitol e celobiose/manitol.

### 3.5 MARCADORES DE ATIVIDADE INFLAMATÓRIA

Vários índices clínicos têm sido propostos para quantificar o grau de atividade da DC, entre eles, destacam-se o Crohn's Disease Activity Index (CDAI) e o Harvey-Bradshaw Index (HBI). O CDAI é considerado padrão para ensaios clínicos e foi desenvolvido a partir da observação inicial de 18 variáveis. Após análise multivariada com o objetivo de desenvolver um índice que melhor predissesse a impressão geral do investigador para cada paciente, oito variáveis foram escolhidas para o cálculo do CDAI (Quadro 2). Esse sistema de classificação possui limitações<sup>27</sup>, como o fato de que 40% do resultado se baseiam em três critérios subjetivos (diarreia, dor abdominal e percepção do próprio estado geral). Em uma escala de pontuação de 0 a 600, é possível quantificar a atividade clínica da doença. Assim, se ocorrer redução de 70 a 100 pontos dos valores iniciais, interpreta-se que houve resposta clínica; se os valores forem inferiores a 150 pontos é indicativo de remissão da doença. O grau de atividade da doença, baseia-se no somatório das diferentes características avaliadas. Caso este se encontre entre 150 a 250 pontos a doença tem atividade leve, entre 250 e 350 a atividade é considerada moderada e acima de 350 interpreta-se como atividade grave da doença<sup>45</sup>.

A velocidade de hemossedimentação (VHS) e proteínas plasmáticas de fase aguda, como a proteína C reativa (PCR), são marcadores sensíveis e inespecíficos de inflamação. A VHS reflete aumento na concentração de proteínas plasmáticas; aumenta tardiamente após o início do processo inflamatório e leva alguns dias para reduzir após a resolução do mesmo e, por isso, tem pouco valor na monitorização de rápidas mudanças na evolução da atividade inflamatória. Os níveis séricos de PCR aumentam rapidamente após o início do processo inflamatório e diminuem logo após a resolução do mesmo, o que torna exame bastante útil para a avaliação do início da atividade inflamatória e de sua resposta ao tratamento. De modo geral, níveis

persistentemente elevados de reagentes de fase aguda em pacientes com DC assintomáticos estão associados a maior risco de recorrência clínica.

A colonoscopia e biópsia da mucosa permanecem como padrão no diagnóstico e avaliação da inflamação intestinal; entretanto são procedimentos invasivos, que requerem a participação de especialistas, preparo intestinal prévio, além de possuírem custo elevado e serem desagradáveis aos pacientes. Devido a esses fatores, a necessidade de métodos rápidos, de menor custo, não invasivos e confiáveis, que possam avaliar o processo inflamatório intestinal, torna-se cada vez mais necessário na prática clínica.<sup>46</sup>

Em pacientes com DII, a presença de processo inflamatório em atividade associa-se à reação de fase aguda e migração de leucócitos para a mucosa do intestino. O contato direto do bolo fecal com a mucosa intestinal, associado ao aumento da permeabilidade intestinal e à perda da função normal de barreira da mucosa, resulta na presença de marcadores específicos nas fezes. Leucócitos, produtos leucocitários e proteínas séricas podem ser encontrados nas fezes de pacientes acometidos por DC.<sup>20</sup>

A calprotectina constitui aproximadamente 5% das proteínas totais e até 60% das proteínas citosólicas dos neutrófilos. É proveniente também, em menor extensão, de monócitos e macrófagos reativos. Possui propriedades bacteriostáticas e fungistáticas, e pode ser encontrada nas fezes de indivíduos com DII em níveis até seis vezes maiores do que no plasma. Devido a sua resistência à degradação, esse marcador possui uma excelente estabilidade nas fezes, sendo determinada por meio de teste imunoenzimático (ELISA). Outras condições, além da DII, cursam com aumento dos níveis de calprotectina fecal, como neoplasias, pólipos, enteropatia por anti-inflamatórios não-esteróides, doença celíaca, microcolite, colite alérgica e infecções entéricas.<sup>6; 20</sup>

A dosagem da calprotectina fecal correlaciona-se fortemente com a excreção fecal de leucócitos marcados com <sup>111</sup>Índio. O alto custo e a exposição danosa à radioatividade limitam o uso do teste com o radioisótopo, em contraste com a relativa facilidade de execução da dosagem da calprotectina fecal.<sup>47</sup>

Diversos estudos têm comparado a calprotectina fecal com índices de atividade e/ou avaliação colonoscópica/histológica na verificação da inflamação intestinal em pacientes com DII. Os resultados destes estudos demonstram que os níveis de calprotectina fecal se

correlacionam fracamente com índices de atividade clínica, porém, apresentam boa concordância com a atividade endoscópica e histológica nas DII.

Roseth *et al*<sup>47</sup> realizaram colonoscopia em pacientes com DII em remissão clínica. Em 38 dos 45 pacientes, os valores de calprotectina estavam abaixo de 50 µg/g, e a avaliação histológica não apresentava alterações. D'Haens *et al.* demonstraram que níveis de calprotectina de até 250µg/g em pacientes com DC, poderia predizer a cicatrização da mucosa com 94% de sensibilidade, 62% de especificidade, e valor preditivo positivo e valor preditivo negativo de 48% e 96%, respectivamente.<sup>48</sup>

Os marcadores fecais, no sentido de predição, também são relacionados à recidiva quando a doença demonstra estar em remissão clínica, com sensibilidade e especificidade de 89% e 82%, para a RCUI, e 87% e 43% para a DC, respectivamente. Mesmo nos pacientes que foram submetidos ao tratamento cirúrgico há correlação dos marcadores fecais com recorrência pós operatória.<sup>49</sup>



## 4 PACIENTES E MÉTODOS

Trata-se de estudo de coorte, no qual foram incluídos 30 pacientes em acompanhamento regular no Ambulatório de Intestino do Instituto Alfa de Gastroenterologia, do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC/UFMG). Foi utilizado o seguinte critério de inclusão: todos os pacientes com diagnóstico de DC, baseado em critérios clínicos, bioquímicos, endoscópicos, radiológicos, cirúrgicos e histopatológicos, que recebessem indicação para o uso de terapia biológica entre o período de agosto de 2012 a agosto de 2014. Foram excluídos dois pacientes que se encaixavam em algum dos critérios de exclusão: doenças crônicas como diabetes mellitus, insuficiência cardíaca, insuficiência renal e gestantes. Dos 30 pacientes que preenchiam o critério de inclusão, seis recusaram-se a participar do estudo; outros dois pacientes não obtiveram leitura nos resultados da permeabilidade intestinal e, por isso, foram excluídos.

### 4.1 ÍNDICE DE ATIVIDADE INFLAMATÓRIA NA DOENÇA DE CROHN

Para avaliar-se o grau de atividade clínica foi utilizado o índice clínico *Crohn's Disease Activity Index* (CDAI)<sup>50</sup>, conforme discriminado no Quadro 2. Os valores de CDAI podem variar entre 0 e 600 pontos. Valores até 150 pontos sugerem que a DC esteja em remissão; entre 150 e 250 pontos, considera-se atividade leve; entre 250 e 350 pontos, atividade moderada e acima de 350, atividade grave da DC.<sup>45</sup> Quanto ao comportamento e localização da DC, adotou-se a classificação de Montreal, proposta por Silverberg *et al.*(2005), conforme descrita no Quadro 1.

No momento da abordagem no ambulatório, os pacientes receberam esclarecimentos a respeito do estudo e das condições necessárias para sua participação. Após aceitarem participar da pesquisa, foram orientados a ler e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 1). Com o objetivo de se avaliar a resposta terapêutica aos anticorpos monoclonais anti-TNF- $\alpha$ , infliximabe e adalimumabe, sobre a barreira intestinal, realizou-se o teste de permeabilidade intestinal antes de se iniciar o tratamento de indução de remissão (T0), e uma semana antes de se iniciar o tratamento de manutenção (T1), isto é, na semana 4 para pacientes que receberam adalimumabe e na semana 13 para aqueles que fizeram uso do infliximabe. Nestes momentos, os pacientes foram submetidos à avaliação clínica completa, realizada pela equipe médica do Ambulatório de Intestino e foram feitos exames bioquímicos tais como hemograma completo, PCR e VHS, além da dosagem da calprotectina fecal. Os exames, com

exceção da dosagem de calprotectina fecal, foram realizados no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da UFMG (HC-UFMG), segundo as técnicas clássicas de rotina.

**Quadro 2: Índice de atividade inflamatória na doença de Crohn (Best et al, 1976)<sup>50</sup>**

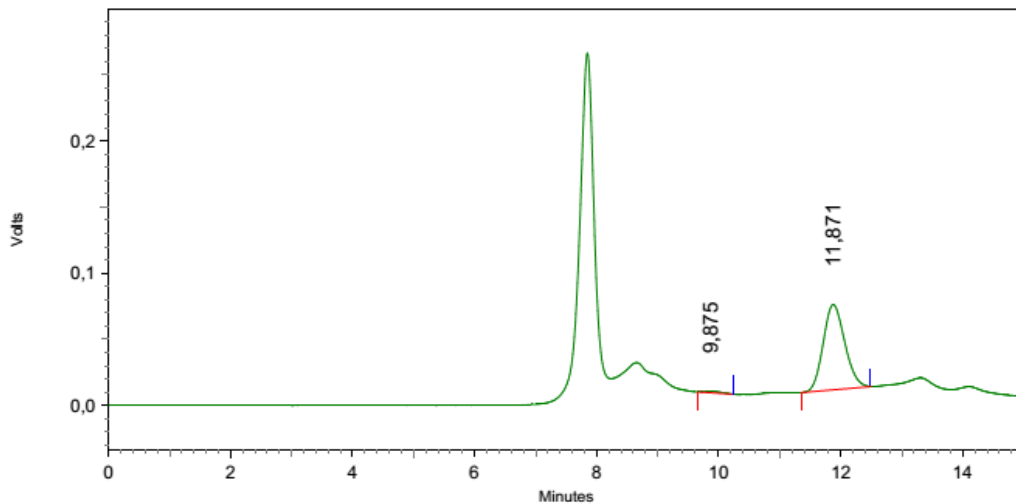
	Multiplicado por
Número de evacuações líquidas na última semana	2
Dor abdominal (ausente = 0, leve = 1, moderada = 2, grave = 3). Considerar a soma total dos dados individuais da última semana	5
Estado geral (ótimo = 0, bom = 1, regular = 2, mau = 3, péssimo = 4). Considerar a soma total dos dados individuais da última semana	7
Nº de sintomas/sinais associados - listar por categorias: a) Artralgia/artrite; b) Irite/uveíte; c) Eritema nodoso/pioderma gangrenoso/aftas orais; d) Fissura anal, fístula ou abscesso; e) Outras fístulas; f) Febre	20 (Valor máximo = 120)
Consumo de antidiarreico (não = 0; sim = 1)	30
Massa abdominal (ausente = 0; duvidosa = 2; bem definida = 5)	10
Déficit do hematócrito: homens: 47-Ht; mulheres: 42-Ht (diminuir em vez de somar no caso Ht de o paciente ser maior do que o padrão)	6
Peso: porcentagem abaixo do esperado (diminuir em vez de somar se o peso do paciente for maior que o esperado)	1

#### 4.2 PERMEABILIDADE INTESTINAL

O teste de permeabilidade intestinal foi realizado por meio da quantificação da taxa excreção urinária de duas substâncias, uma macromolécula (lactulose) e uma micromolécula (manitol).

Após oito horas de jejum, o paciente comparecia ao HC - UFMG pela manhã e, em seguida era orientado a eliminar qualquer eventual resíduo urinário. Uma solução padrão contendo 6,25g de lactulose cristalina a 95% (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, EUA) e 3,0g de manitol (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, EUA), diluídos em quantidade suficiente de água para completar 120mL, era ingerida pelo paciente. A osmolaridade dessa solução é semelhante à plasmática, com a finalidade de se

evitar qualquer dano ao epitélio estudado. Durante as cinco horas seguintes toda urina era coletada em frasco vedado, com a finalidade de se evitar a perda por evaporação das substâncias contidas na urina. Ao final desse período, o volume urinário total era aferido e uma alíquota de 50mL era armazenada em um segundo frasco, ao qual adicionavam-se 12mg de timerosal (Synth<sup>®</sup>, Brasil), para impedir o crescimento bacteriano. As amostras foram submetidas a preparo pré-analítico, que consistiu na passagem por resina de troca iônica (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, EUA) e filtração em filtro Millex<sup>®</sup>, 0,22µm de poro (Merck Millipore<sup>®</sup>, EUA) . Em torno de 2mL de cada amostra foi armazenado em freezer, sob temperatura de -20°C, permitindo assim, a utilização dessas amostras em ocasiões futuras.



**Figura 1: Cromatograma de amostra de urina de um paciente do estudo. (Lactulose: tempo de retenção = 9,875; manitol: tempo de retenção = 11,871)**

Para a dosagem das substâncias foi utilizado o aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) (Schimadzu<sup>®</sup>, Japão). Para tal, pequena quantidade de urina (50µL), foi introduzida no aparelho através do um auto-injetor. A lactulose foi diferenciada do manitol após separação exercida pela pré-coluna Supelcogel 33H<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, USA) e pela coluna Phenomenex H<sup>+</sup><sup>®</sup> (Phenomenex<sup>®</sup>, USA). No módulo que opera por índice de refração, amplitudes diferentes de ondas geradas pela solução contendo a lactulose e o manitol são captadas e interpretadas pelo software do HPLC, em tempos de retenção diferentes, proporcionados pela separação ocorrida na pré-coluna e coluna. Tais leituras de amplitude de onda são condicionadas em elementos gráficos, os cromatogramas, exemplificados pela Figura 1.

Para a padronização do teste e obtenção dos valores das amostras, medidos na unidade g/L, quantidades conhecidas de lactulose e manitol foram avaliadas em separado e

repetidamente no HPLC, com a finalidade de se construir a curva de calibração e a equação da reta para cada um dos padrões, por meio de ajuste por regressão linear simples ( $y = ax + b$ ). Por meio dessa equação é possível calcular a concentração dos analitos nas amostras dos pacientes. (Figuras 2 e 3).

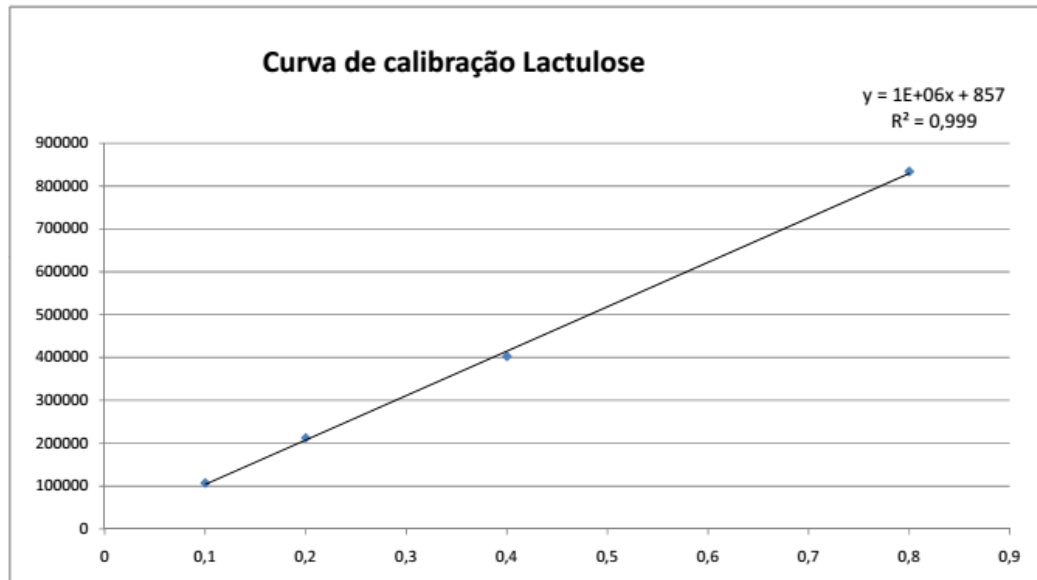


Figura 2: Curva de calibração e equação da reta para a lactulose.

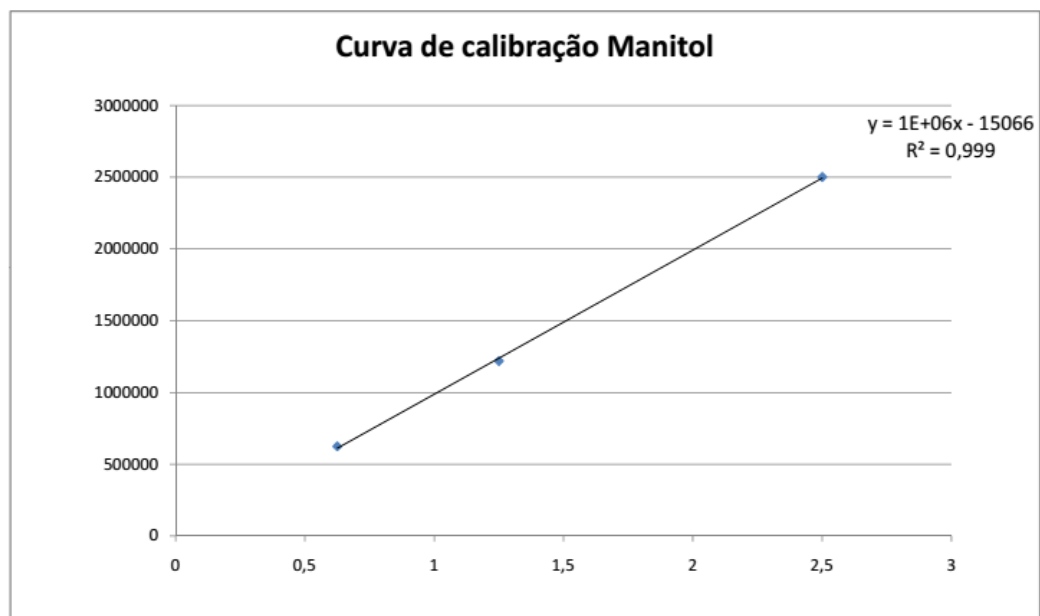


Figura 3: Curva de calibração e equação da reta para o manitol.

Após a obtenção das duas equações da reta, o material a ser analisado era introduzido no aparelho e interpretado pelo software e, assim, foram obtidos os números que representam

as áreas sob as curvas. Esses números indicam os valores de y em mV e, uma vez aplicada a equação da reta, determinava-se os valores de x. Em seguida, calculava-se as taxas de excreção da lactulose e do manitol por meio das seguinte fórmula:

$$\text{Lactulose} = \frac{L \times \text{vol. (u)}/1000}{6,25} \times 100$$

Sendo: 1) L, a concentração de lactulose na urina, em g/L; 2) vol(u), o volume urinário obtido em cinco horas de coleta e 3) denominador 6,25, correspondente à quantidade total de lactulose administrada ao paciente.

$$\text{Manitol} = \frac{M \times \text{vol. (u)}/1000}{3,00} \times 100$$

Sendo: 1) M a concentração de manitol na urina, em g/L; 2) vol(u), o volume urinário obtido em cinco horas de coleta e 3) denominador 3,00, correspondente à quantidade total de manitol administrada ao paciente.

Finalmente, a relação entre a taxa de excreção urinária das duas substâncias foi obtida dividindo-se a taxa de excreção da lactulose pela taxa de excreção do manitol. Os resultados dos testes de permeabilidade foram analisados utilizando-se a relação entre as taxas de excreção urinária da lactulose e do manitol (L/M).

O laboratório onde foi realizado o teste de permeabilidade intestinal dispunha de resultados de permeabilidade intestinal de indivíduos saudáveis, que não possuem doença inflamatória intestinal, para compor o grupo controle.

#### 4.3 CALPROTECTINA FECAL

A dosagem da calprotectina fecal foi realizada em amostras de fezes coletadas pelos pacientes, por ocasião da realização do teste de permeabilidade intestinal. A dosagem foi feita por meio do teste imunoenzimático (ELISA) (Bühlmann®, Suíça). As amostras foram submetidas ao processo de extração da calprotectina, que consistiu na pesagem de 50mg de fezes que foram misturadas a 2,5 mL da solução padrão de extração fornecido pelo fabricante. Essa mistura, foi submetida à agitação durante 30 minutos. Decorrido o tempo, a amostra foi centrifugada por cinco minutos a 3000g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e procedeu-se a realização do ELISA. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450nm. O exame foi realizado em duplicata, para reduzir a possibilidade de erros. Para construção da curva de calibração utilizou-se soluções padrões

fornecidas pelo fabricante, nas seguintes concentrações 30 µg/g, 90 µg/g, 300 µg/g, 900 µg/g e 1800 µg/g,. A solução com concentração igual a 0 µg/g foi utilizada para correções de leitura.

#### 4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as análises foram feitas no PASW Statistics 18<sup>®</sup> (antigo SPSS Statistics). Para comparação dos resultados antes e após a terapia com os anticorpos anti TNF- $\alpha$ , foi aplicado os testes pareado Test t de Student ou de Wilcoxon, dependendo da distribuição normal ou não das variáveis estudadas. Já as correlações entre variáveis foram extraídas a partir do coeficiente de correlação  $\rho$  de Spearman.

A significância estatística foi aceita para valores  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

Foram incluídos no estudo 22 pacientes com diagnóstico de DC, sendo 13 do sexo feminino (59,1%) e nove masculino (40,9%). A idade variou entre 15 a 56 anos, com média de 38,0 anos (DP=12,8). A distribuição dos pacientes por faixa etária está sumarizada no Quadro 3:

**Quadro 3: Distribuição dos 22 pacientes por faixa etária**

Faixa etária (anos)	n (%)
15-25	4 (18,2)
26-35	5(22,7)
36-45	5 (22,7)
46-55	7 (31,8)
56-65	1 (4,5)

A classificação quanto a idade ao diagnóstico da DC, foi realizada segundo a Classificação de Montreal e está sumarizada no Quadro 4:

**Quadro 4: Distribuição dos 22 pacientes de acordo com a idade ao diagnóstico da DC, segundo a Classificação de Montreal<sup>26</sup>**

Idade ao diagnóstico	n (%)
A1 - 16 anos ou menos	2 (9,1 )
A2 - 17 a 40 anos	14 (63,6)
A3 - maior que 40 anos	6 (27,3)

Em relação à localização da doença, a maior parte dos pacientes (63,6%) apresentou acometimento ileocolônico (L3). Nenhum paciente apresentou acometimento do trato gastrointestinal superior, seja isoladamente ou concomitante às outras localizações da doença. (Quadro 5)

**Quadro 5: Distribuição dos 22 pacientes de acordo com a localização da doença, segundo a Classificação de Montreal<sup>26</sup>**

Localização da doença	n (%)
L1 - íleo terminal	7 (31,8)
L2 - cólon	1 (4,5)
L3 - ileocolônica	14 (63,6)

Em relação ao comportamento da doença (Quadro 6), dos 10 pacientes (45,4%) que apresentavam a forma penetrante da doença (B3), quatro deles (18,2%) também apresentavam acometimento perianal (B3p).

**Quadro 6: Distribuição dos 22 pacientes de acordo com o comportamento da doença, segundo a Classificação de Montreal<sup>26</sup>**

Comportamento da doença	n (%)
B1 - Não estenosante e não penetrante	4 (18,2)
B2 - Estenosante	8 (36,4)
B3 - Penetrante	10 (45,4%)*

\* Acometimento perianal em 4 (18,2%) pacientes.

O adalimumabe foi a terapêutica indicada para 16 (72,7%) pacientes, sendo que os outros seis (27,27%) fizeram uso de infliximabe. A decisão em relação a qual o medicamento a ser utilizado foi tomada em conjunto, médico e paciente, levando-se em consideração o uso prévio ou não da terapia biológica, a via de aplicação da droga e a preferência do paciente. As indicações para o uso do anti-TNF-  $\alpha$  foram: dois (9,1%) pacientes apresentavam quadro de grave atividade clínica da DC; em três (13,6%) casos a indicação foi o tratamento de fístulas; 12 (54,5%) pacientes evoluíram com corticoide dependência e cinco (22,73%) casos mostraram-se e refratários ao uso do tratamento convencional.

Todos os pacientes incluídos no estudo faziam uso de pelo menos um medicamento antes do início da terapia biológica, seja para tratamento da DC ou para abordagem de complicações associadas, tais como fístula e abscessos. Os esquemas terapêuticos adicionais foram seguidos após o início da terapia biológica, de acordo com a indicação médica pregressa. Entre os medicamentos utilizados estavam a azatioprina, 6-mercaptopurina, metotrexato, prednisona, sulfasalazina, mesalazina, ciprofloxacino e metronidazol. A frequência com que a medicação foi utilizada está sumarizada no Quadro 7.



**Quadro 7: Frequência do uso dos medicamentos, antes do início da terapia com os anticorpos anti-TNF- $\alpha$ , nos 22 pacientes com doença de Crohn**

Medicamento	n(%)
Azatioprina	16 (72,7)
Prednisona	14 (63,6)
Sulfasalazina	4 (18,2)
Mesalazina	10 (45,4)
Ciprofloxacino	4 (18,2%)
Metronidazol	4 (18,2)
6-mercaptopurina	2 (9,1)
Metotrexato	1 (4,5)

### 5.1 ÍNDICE DE ATIVIDADE INFLAMATÓRIA NA DOENÇA DE CROHN

Dos 22 pacientes incluídos no estudo, 18 tiveram a atividade clínica da doença avaliada pelo CDAI, mas, apenas 13 repetiram o preenchimento do cartão na segunda avaliação. Desses, em oito houve redução dos valores do CDAI. Porém, a comparação das medianas iguais a 107,5 pontos ( $q_1=79,0$ ;  $q_3=202,2$ ) em T0, e 104 pontos ( $q_1=48,0$ ;  $q_3=134,5$ ) em T1, não evidenciou diferença entre os valores ( $p=0,093$ ).

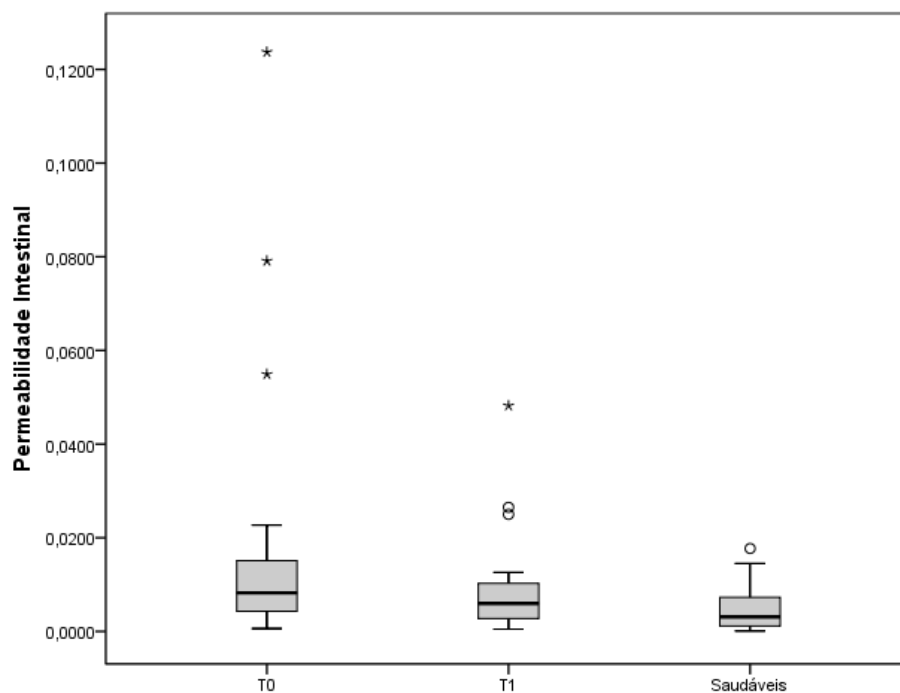
### 5.2 AVALIAÇÃO DOS MARCADORES BIOQUÍMICOS DE ATIVIDADE INFLAMATÓRIA

Todos os 22 pacientes realizaram a dosagem da PCR antes do início do tratamento com terapia biológica e 20 repetiram a dosagem antes do início do tratamento de manutenção. Dentre os indivíduos que repetiram o exame, 10 pacientes (50,0%) apresentaram redução nos níveis de PCR. A comparação das medianas não evidenciou diferença entre T0(5,6 mg/L ( $q_1=5,0$ ;  $q_3=15,4$ )), e T1 (5 mg/L ( $q_1=5,0$ ;  $q_3=5,7$ )) ( $p=0,272$ ).

A medida da VHS foi realizada em 20 pacientes antes do início do tratamento, sendo que 17 indivíduos repetiram o exame após a abordagem terapêutica. Em oito (40,0%) casos houve queda na VHS, porém a comparação entre as medianas em T0(14mm/h ( $q_1=6,25$ ;  $q_3=22,0$ )) e T1, (8mm/h ( $q_1=6,0$ ;  $q_3=18,5$ )) não mostrou diferença entre os valores ( $p=0,925$ ).

### 5.3 PERMEABILIDADE INTESTINAL

Dos 22 pacientes incluídos no estudo, dois não completaram sua participação, realizando apenas a avaliação antes do início do tratamento (T0). Dos 20 casos que se submeteram às duas avaliações da permeabilidade intestinal, em 14 (70%) casos houve redução da permeabilidade intestinal. A análise comparativa entre as medianas da taxa de excreção de lactulose/manitol mostrou uma tendência à redução desta, com valores de 0,0082 em T0 ( $q1=0,004$ ;  $q3=0,016$ ), e 0,0059 em T1 ( $q1=0,003$ ;  $q3=0,011$ ) ( $p=0,057$ ) (Figura 4). Quando se comparou os valores de manitol, antes e após a intervenção terapêutica, não se observou diferença estatisticamente significativa para os valores das médias, que foram em T0 de 14,46% (IC 95%: 12,64 e 16,30%) e em T1 de 15,83%, (IC 95%: 12,86 e 18,81%). Ao se comparar a variação da excreção da lactulose antes e após a intervenção terapêutica, observou-se redução de 37,5% da permeação desse carboidrato, comparando-se as medianas dos períodos avaliados: 0,12% em T0 ( $q1=0,07$ ;  $q3=0,18$ ) para 0,075% em T1 ( $q1=0,05$ ;  $q3=0,14$ ) diferença com significância estatística. (Quadro 8)



**Figura 4: Box-plot para valores de permeabilidade intestinal em T0, T1 e de indivíduos saudáveis.**

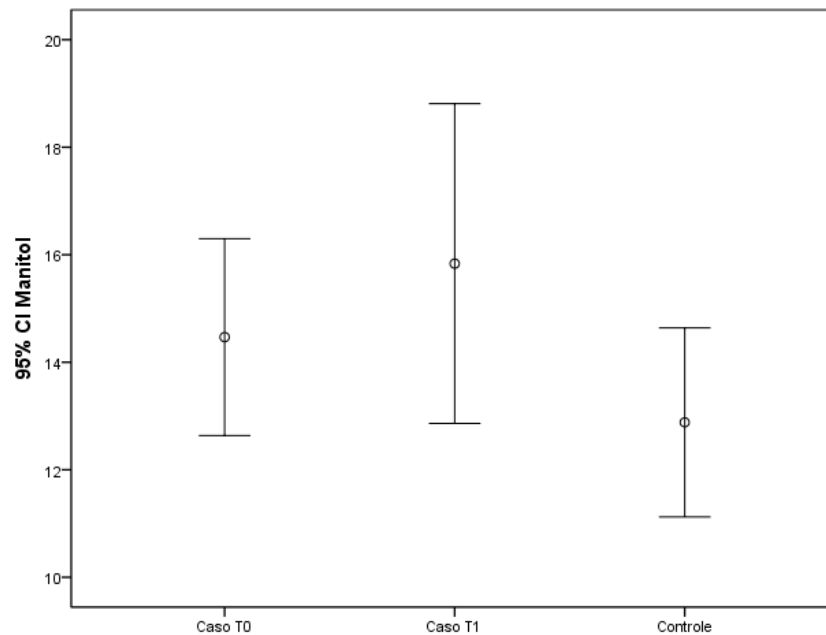
**Quadro 8 : Valores de manitol, lactulose e permeabilidade intestinal antes e após o tratamento com anti-TNF- $\alpha$ .**

	T0	T1	Valor de p
Excreção do manitol <sup>1</sup>	14,46%	15,83%	0,352
Excreção da lactulose <sup>2</sup>	0,1200%	0,0750%	0,026
Permeabilidade intestinal <sup>2</sup>	0,0082	0,0059	0,057

1.Média

2.Mediana

Comparando-se os resultados dos pacientes com o grupo de indivíduos controle (Figura 5), tanto em T0 quanto em T1, constatou-se não haver diferença estatística para os valores de excreção de manitol ( $p=0,208$  e  $p=0,067$ , respectivamente). A média da dosagem de manitol para o grupo controle foi de 12,88% (IC 95%:11,12 a 14,64%). No entanto, ao se avaliar a excreção da lactulose, mesmo após o tratamento com anticorpos anti TNF- $\alpha$ , o valor da mediana se apresentou maior do que o encontrado para os indivíduos saudáveis (0,0400%), com significância estatística para a comparação tanto em T0, quanto em T1 ( $p=0,004$  e  $p=0,049$ , respectivamente) (Figura 6).



**Figura 5: Error-plot para valores de dosagem de manitol em T0, T1 e para grupo controle.**

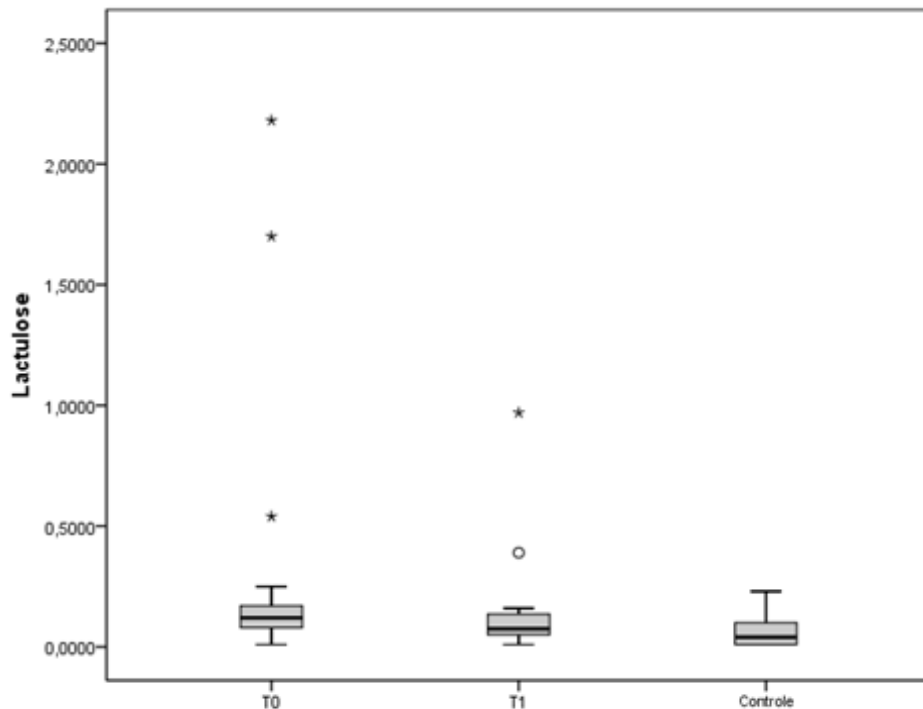


Figura 6: Box-plot para valores de dosagem de lactulose em T0, T1 e para grupo controle.

#### 5.4 CALPROTECTINA FECAL

A dosagem de calprotectina antes do início do tratamento com biológico (T0) foi realizada em 16 pacientes. A dosagem em T1 foi feita em amostras de 14 pacientes. A comparação das medianas da dosagem de calprotectina fecal não revelou diferença entre os valores em T0, 461,50  $\mu\text{g/g}$  ( $q1=112,0$ ;  $q3=1442,0$ ), e T1, 271,85  $\mu\text{g/g}$  ( $q1=72,25$ ;  $q3=1598,00$ ) ( $p=0,859$ ).

#### 5.5 CORRELAÇÕES P DE SPEARMAN

O coeficiente  $\rho$  de Spearman varia entre -1 e 1. Quanto mais próximo estiver destes extremos, maior será a associação entre as variáveis. O sinal negativo da correlação significa que as variáveis variam em sentido contrário, isto é, as categorias mais elevadas de uma variável estão associadas a categorias mais baixas da outra variável. Já o sinal positivo da correlação significa que as variáveis variam em um mesmo sentido.

A comparação entre os valores de permeabilidade e calprotectina, por meio da correlação de Spearman, não evidenciou correlação entre as variáveis, como pode ser visto no Quadro 9, haja vista que o coeficiente foi próximo de 0.

**Quadro 9: Correlação de Spearman para os valores da permeabilidade intestinal e calprotectina fecal, antes e após o tratamento com terapia biológica.**

	Permeabilidade T0 versus Calprotectina T0	Permeabilidade T1 versus Calprotectina T1
Coeficiente $\rho$ de	0,032	0,031
Valor de p	0,905	0,917

Ao se fazer a correlação entre a permeabilidade intestinal e os diferentes marcadores de atividade inflamatória utilizadas no estudo, observou-se que antes da intervenção terapêutica, não houve correlação que mostrasse significância estatística. No entanto, a mesma avaliação realizada após o período de indução da remissão mostrou correlação positiva entre os valores de permeabilidade intestinal e PCR (coeficiente = 0,519 e  $p=0,033$ ), evidenciada no Quadro 10.

**Quadro 10: Análise das correlações entre permeabilidade intestinal e demais parâmetros inflamatórios (correlação de Spearman).**

	Permeabilidade Intestinal T0 Correlação de Spearman / p	Permeabilidade Intestinal T1 Correlação de Spearman / p
Calprotectina fecal	0,032 / 0,905	0,031 / 0,917
CDAI	0,132 / 0,625	-0,236 / 0,437
PCR	0,297 / 0,180	0,519 / 0,033
VHS	0,253 / 0,281	0,196 / 0,466

A correlação entre a calprotectina fecal e os demais marcadores bioquímicos também não evidenciou nenhuma correlação com significância estatística, antes do início da terapia

biológica. Após o período de indução da remissão, os níveis de calprotectina e a VHS evidenciaram forte correlação positiva (coeficiente= 0,678 e p=0,031) Quadro 11.

**Quadro 11: Análise das correlações entre calprotectina fecal e demais parâmetros inflamatórios (correlação de Spearman).**

	Calprotectina fecal T0 Correlação de Spearman / p	Calprotectina fecal T1 Correlação de Spearman / p
CDAI	0,375/0,230	-0,218/0,519
PCR	-0,120/0,659	0,126/0,711
VHS	0,106/0,718	0,678/0,031

## 6 DISCUSSÃO

Decorridos mais de oitenta anos da publicação do importante trabalho de Crohn, Ginzburg e Oppenheimer novos conhecimentos a respeito da DC foram incorporados, levando a melhor compreensão da etiopatogênese, bem como da sua história natural.<sup>2</sup> Sabe-se que a doença tem origem na resposta imune anormal aos estímulos intraluminais, principalmente, aqueles oriundos da flora entérica, em indivíduos geneticamente susceptíveis.<sup>51</sup> A estimulação contínua do sistema imune da mucosa pode ser resultado do aumento da permeabilidade do epitélio intestinal, a qual alguns autores sugerem constituir uma das alterações primárias dos indivíduos com DII.<sup>31</sup> A função de barreira exercida pelo epitélio está relacionada à presença das junções firmes, que unem os enterócitos adjacentes e determinam o espaço paracelular.<sup>52</sup>

O TNF- $\alpha$ , citocina pró-inflamatória, desempenha papel central na inflamação intestinal na DC, como também, associa-se às alterações estruturais das junções firmes. Assim, pode-se presumir que, além de bloquear a cascata imunoinflamatória responsável pela inflamação crônica, os anticorpos anti-TNF- $\alpha$ , podem influenciar a função de barreira do intestino, com redução da permeabilidade intestinal.<sup>12</sup> 22 pacientes com DC foram analisados neste estudo, dos quais 59,09% eram do sexo feminino, com média de idade igual a 38 anos. A maior parte dos pacientes (63,64%) apresentou acometimento ileocolônico da doença, sendo que nenhum deles apresentou manifestações no trato gastrointestinal superior. Em relação ao comportamento da doença, os fenótipos mais comuns foram o estenosante e o penetrante (36,36% e 27,27%, respectivamente). A terapia biológica de escolha foi o adalimumabe em 72,72% dos casos.

Os resultados do presente estudo demonstraram uma tendência à diminuição da permeabilidade intestinal, após o início do tratamento com os anticorpos anti TNF- $\alpha$  (adalimumabe ou infliximabe), em 70% dos casos estudados com queda da relação lactulose/manitol de 0,0082 em T0 para 0,0059 em T1 ( $p=0,057$ ). Este resultado evidencia uma tendência à melhora da função de barreira intestinal, através da redução da permeabilidade intestinal, resultado que é corroborado por outros autores como Noth *et al*<sup>42</sup> que evidenciou redução da relação lactulose/manitol no soro de pacientes com DC, de 0,24 para 0,02 ( $p<1 \times 10^{-7}$ ), sete dias após o início do tratamento com infliximabe. Suenart *et al*<sup>5</sup>, estudando a permeabilidade intestinal por meio da excreção do <sup>51</sup>Cr-EDTA, também, registrou queda nos valores desta, quatro semanas após infusão do infliximabe.<sup>5; 42</sup>

Ao avaliar-se de forma independente as vias de permeação do manitol e da lactulose, observou-se que a redução da permeabilidade intestinal ocorreu em razão da diminuição da permeação da lactulose, tendo em vista que os valores de manitol não apresentaram diferença. A redução da permeabilidade intestinal demonstrada por Noth *et al*<sup>42</sup> também foi determinada por redução da permeação de lactulose..Há de se ter cautela ao avaliar-se as taxas de excreção dissociadas da relação lactulose/manitol, já que o emprego de dois açúcares é feito para eliminar possíveis interferentes não relacionados à barreira mucosa, tais como variações individuais (esvaziamento gástrico, trânsito intestinal, diluição por secreções, *clearance* renal alterado) e, inclusive, erros analíticos. Porém, no presente estudo, como não houve variação da taxa de excreção do manitol, é pouco provável que os fatores extra mucosos tenha interferido na análise.

A lactulose é o carboidrato que avalia a via paracelular da barreira intestinal. Esta é regulada, principalmente, pela quantidade e integridade das junções firmes. As ocludinas e claudinas, são as principais proteínas que compõem as junções firmes e estudos têm demonstrado que o TNF- $\alpha$  é responsável pela infrarregulação de ocludina, claudina 3, 5 e 8, além da redistribuição das mesmas, influenciando desta forma a função de barreira do epitélio intestinal<sup>53</sup>. O trabalho de Suenart *et al*<sup>5</sup> demonstrou que o tratamento com anticorpos anti-TNF- $\alpha$  promove a restauração da função de barreira do intestino, ao constatar queda na permeação do <sup>51</sup>Cr-EDTA de 3,27% para 2,42%, quatro semanas após a primeira infusão de infliximabe. A neutralização do TNF- $\alpha$  parece interferir na função da barreira intestinal, com melhora da permeabilidade intestinal, não só ao suprimir o processo inflamatório da mucosa, como também bloqueando a ação que o TNF- $\alpha$  exerce sobre as junções firmes.<sup>5</sup>

Fischer *et al*<sup>18</sup> demonstraram em modelos para o estudo da permeabilidade intestinal *in vitro*, a diminuição da resistência elétrica transepitelial em monocamadas de células do tipo Caco-2, após a administração de TNF- $\alpha$ . Este efeito foi revertido após a administração de 10 $\mu$ g/mL de adalimumabe, concentração habitualmente observada no soro de pacientes em tratamento com esse medicamento e que não desenvolvem anticorpos anti-adalimumabe.<sup>18</sup>

Estudos têm demonstrado que a quantificação da calprotectina fecal apresenta boa correlação com os índices de atividade clínica, endoscópica e histológica. No presente estudo, não houve diferença dos valores das medianas da calprotectina fecal de 461,5  $\mu$ g/g para 271,85  $\mu$ g/g (p=0,859) após a intervenção terapêutica. Roseth *et al*<sup>47</sup> validaram a dosagem de calprotectina fecal como marcador de inflamação intestinal, após compará-la à excreção de neutrófilos marcados com <sup>111</sup>Índio, demonstrando também a sua correlação com a cicatrização



de mucosa. Dessa forma, a melhora do processo inflamatório após o tratamento com terapia biológica pode ser avaliada por meio da dosagem desse marcador fecal. Nogueira *et al*<sup>53</sup> ao avaliarem os níveis de calprotectina fecal em indivíduos com DC antes da primeira infusão de infliximabe, e oito semanas após o início do tratamento, evidenciaram redução dos valores da calprotectina de 682,53mg/kg para 414,5mg/kg, indicando melhora do processo inflamatório.<sup>53</sup> Sipponen *et al*<sup>54</sup> avaliaram pacientes em uso de infliximabe; estes autores modificaram o esquema habitual de indução de remissão (administração do medicamento nas semanas a zero, dois e seis) para a semana zero seguida por intervalo de oito semanas. Estes autores observaram queda dos valores de mediana da calprotectina fecal de 1173µg/g antes do início do tratamento, para 325 µg/g e 130 µg/g nas semanas oito e 12 de reavaliação, respectivamente<sup>54</sup>. A redução dos níveis de calprotectina fecal provavelmente se deve não somente à melhora do dano estrutural da mucosa, após tratamento com infliximabe, mas também à redução do infiltrado inflamatório e ao desaparecimento de neutrófilos, conforme verificado por D'Haens *et al.* em ensaio clínico multicêntrico realizado na Europa.<sup>55</sup>

Sabe-se que a mucosa intestinal pode exibir inflamação subclínica em pacientes com DC que alcançam remissão clínica e, por esse motivo, esse padrão de remissão não é o único parâmetro utilizado para determinar-se se a doença está inativa. Nesse contexto são discutidos os objetivos terapêuticos, que atualmente visam não só remissão clínica, mas também a remissão endoscópica. Pacientes com DC, mesmo que em remissão clínica, apresentam níveis de calprotectina fecal e permeabilidade intestinal acima dos valores apresentados por indivíduos saudáveis, o que provavelmente decorre da inflamação remanescente.<sup>53</sup> Porém, o presente estudo não evidenciou diferença entre os valores de permeabilidade intestinal dos pacientes após o início do tratamento com terapia biológica (0,0059) e o grupo de indivíduos controle (0,0031) ( $p > 0,05$ ). Em decorrência do desenho do estudo, 55,6% dos pacientes à inclusão tinham CDAI inferior a 150 pontos (mediana=107,5 pontos), a despeito de terem manifestações clínicas condizentes com a doença ativa. Todos os pacientes, estavam em uso de pelo menos um medicamento para controle da atividade da doença e obtiveram indicação do início da terapia com os anti-TNF- $\alpha$  pelas seguintes razões: corticoide dependência, corticoide resistência ou abordagem de fístulas. Assim, encontravam-se em controle parcial da atividade inflamatória, o que repercute na quantificação do índice clínico de avaliação da inflamação, possivelmente resultando em valores de CDAI inferiores ao esperado para doença em atividade. Além disso, diferentes autores sugerem que o CDAI é mais preciso para avaliar a atividade inflamatória nos pacientes com doença com o comportamento inflamatório.<sup>27</sup> Haja vista que a menor parte dos

pacientes avaliados no estudo apresentavam o perfil inflamatório da DC (18,2%), justifica-se parcialmente o fato de um pouco mais da metade apresentar valores de CDAI correspondentes à doença em remissão.

Comportamento semelhante foi observado em relação aos marcadores séricos da atividade inflamatória, a PCR e a VHS, que em alguns pacientes exibiram redução dos níveis séricos após a abordagem terapêutica, apesar de não terem significância estatística. A casuística pequena pode justificar a ausência de significância estatística.

Ao se avaliar a correlação entre os marcadores de atividade inflamatória, observou-se correlação positiva entre permeabilidade intestinal e PCR (coeficiente= 0,519 e  $p=0,033$ ). Considerando que o comprometimento da função de barreira intestinal propicia uma maior exposição do sistema imune da mucosa intestinal aos estímulos imunogênicos luminais e os quais, são responsáveis pelo início e perpetuação da resposta inflamatória, poder-se-ia presumir que a restauração alcançada com a terapia com o anti-TNF- $\alpha$  reduz a ativação e magnitude da resposta inflamatória, e esta repercute na diminuição da síntese de proteínas de fase aguda, como a PCR. Estudos demonstraram que tanto a permeabilidade intestinal, quanto a dosagem da PCR são capazes de prever recidivas da doença. Estudo longitudinal envolvendo 101 pacientes com DC, mostrou que aqueles pacientes que mantinham a PCR elevada por 2 anos, possuíam maior taxa de reativação da doença quando comparada aos pacientes com níveis normais dessa proteína.<sup>27</sup> Arnott *et al*<sup>41</sup> demonstraram que pacientes com DC em remissão, mas com alteração dos valores de permeabilidade intestinal apresentam risco aumentado (risco relativo = 18) para a reativação da doença, quando comparados àqueles com permeabilidade normal.<sup>41</sup> Wyatt *et al*<sup>56</sup>, em estudo que avaliou 72 pacientes com DC, encontraram correlação significativa entre o valor de permeabilidade intestinal e a probabilidade de reativação da doença. Sugerindo que o aumento do valor da permeabilidade intestinal precede a recidiva clínica e que esta constitui indicador de doença subclínica.<sup>56</sup>

Houve, também forte correlação positiva entre os valores de calprotectina fecal e VHS (coeficiente=0,678 e  $p=0,031$ ). A VHS é marcador sorológico é inespecífico, e pode sofrer interferência de diversas condições não intestinais. Embora sua avaliação não seja capaz de mensurar diretamente a atividade inflamatória intestinal<sup>53</sup>, se associado à dosagem de calprotectina fecal, poderia fornecer informações mais robustas em relação à resposta ao tratamento com anticorpos anti TNF- $\alpha$ , já que ambos se correlacionam de maneira positiva.

## 6.1 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

O primeiro aspecto que limitou os resultados do presente estudo foi a casuística relativamente pequena, haja vista que dos 30 pacientes convidados a participarem do estudo, 22 efetivaram sua participação. Entretanto, outros trabalhos que abordam o tema proposto possuem casuística semelhante, com 17 a 23 pacientes avaliados, a exemplo dos trabalhos de Noth *et al*<sup>42</sup>, Suenart *et al*<sup>5</sup>, Roseth *et al*<sup>47</sup> e Nogueira *et al*<sup>53</sup>. Em razão da literatura já ter demonstrado queda dos parâmetros inflamatórios tais como PCR, VHS e calprotectina fecal após terapia biológica, é provável que com o aumento da casuística seria possível demonstrar a diferença nesses fatores.

Foi possível constatar que parcela significativa dos pacientes avaliados no primeiro momento do estudo (T0) não repetiram a avaliação em T1, para alguns dos parâmetros. Um dos motivos está ligado ao fato de os indivíduos incluídos no estudo serem assistidos em um ambulatório referência no sistema de saúde estadual. Dessa maneira, diversos pacientes residem em cidades do interior de Minas Gerais e compareciam ao serviço em datas específicas. Levando em consideração o fato de que as avaliações eram feitas em momentos específicos do tratamento com os anticorpos anti-TNF- $\alpha$ , qualquer lacuna não poderia ser preenchida posteriormente. A exemplo do cálculo do CDAI, que dependia do preenchimento do cartão pelo paciente: caso o paciente se esquecesse de preencher ou levar o cartão ao momento da avaliação, não era possível repeti-lo em outra ocasião. Essa conjuntura justifica em parte a perda de dados no segundo momento de avaliação.

## 7 CONCLUSÃO

Embora os valores de CDAI, PCR, VHS e calprotectina não demonstrarem diferença entre as avaliações ante e após o início do tratamento com anticorpos anti- TNF- $\alpha$ , houve uma tendência à redução da permeabilidade intestinal. A taxa de excreção da lactulose/manitol poderia ser utilizada como um marcador clínico da resposta à terapia biológica sobre a permeabilidade da mucosa. Porém, não é possível afirmar se isso é resultado de um efeito direto dos anticorpos anti-TNF- $\alpha$  por cicatrização da mucosa ou efeito indireto na permeabilidade por atenuação do processo inflamatório. É possível que ambos processos atuem em conjunto, ocasionando a melhora da função de barreira da mucosa intestinal.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- <sup>1</sup> QUILICI, F. A.; QUILICI, L. C. M. História da doença inflamatória intestinal. In: CARDOZO, W. S. e SOBRADO, C. W. (Ed.). **Doença inflamatória intestinal**. 1ª. Barueri, SP: Editora Manole, 2012. cap. 1, p.1-10.
- <sup>2</sup> MANTZARIS, G. J. When can we cure Crohn's? **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 28, n. 3, p. 519-29, Jun 2014. ISSN 1532-1916. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24913390> >.
- <sup>3</sup> CARDOZO, W. S.; SOBRADO, C. W. Manifestações clínicas na doença inflamatória intestinal. In: CARDOZO, W. S. e SOBRADO, C. W. (Ed.). **Doença Inflamatória Intestinal**. 1ª. Barueri, SP: Editora Manole Ltda., 2012. cap. 6, p.65-84.
- <sup>4</sup> SLEISENGER, M. H. et al. **Sleisenger and Fordtran's gastrointestinal and liver disease: pathophysiology, diagnosis, management**. 9th. Philadelphia, PA, USA.: Saunders/Elsevier, 2010.
- <sup>5</sup> SUENAERT, P. et al. Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease. **Am J Gastroenterol**, v. 97, n. 8, p. 2000-4, Aug 2002. ISSN 0002-9270. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12190167> >.
- <sup>6</sup> ISKANDAR, H. N.; CIORBA, M. A. Biomarkers in inflammatory bowel disease: current practices and recent advances. **Transl Res**, v. 159, n. 4, p. 313-25, Apr 2012. ISSN 1878-1810. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22424434> >.
- <sup>7</sup> CORRÊA, P. A. F. P.; LOUREIRO, J. F. M. Diagnóstico endoscópico na doença inflamatória intestinal. In: CARDOZO, W. S. e SOBRADO, C. W. (Ed.). **Doença inflamatória intestinal**. Barueri, SP: Manole, 2012. cap. 16, p.155-164.
- <sup>8</sup> VICTORIA, C. R.; SASSAKI, L. Y.; NUNES, H. R. C. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel disease, in midwestern of São Paulo state, Brazil. **Arq Gastroenterol**, v. 46, n. 1, p. 6, 2009.

- <sup>9</sup> LOFTUS, E. V. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. **Gastroenterology**, v. 126, n. 6, p. 1504-17, May 2004. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15168363> >.
- <sup>10</sup> LOGAN, I.; BOWLUS, C. L. The geoeidemiology of autoimmune intestinal diseases. **Autoimmun Rev**, v. 9, n. 5, p. A372-8, Mar 2010. ISSN 1873-0183. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19903540> >.
- <sup>11</sup> SALIM, S. Y.; SÖDERHOLM, J. D. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. **Inflamm Bowel Dis**, v. 17, n. 1, p. 362-81, Jan 2011. ISSN 1536-4844. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20725949> >.
- <sup>12</sup> YE, D.; MA, I.; MA, T. Y. Molecular mechanism of tumor necrosis factor-alpha modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 290, n. 3, p. G496-504, Mar 2006. ISSN 0193-1857. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16474009> >.
- <sup>13</sup> VILELA, E. G. et al. Estudo da Permeabilidade Intestinal em Afecções Digestivas. In: SAVASSI-ROCHA, P. R.; COELHO, L. G. V., *et al* (Ed.). **Tópicos em Gastroenterologia - Avanços em Gastroenterologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v.15, 2006. cap. 3, p.27-47.
- <sup>14</sup> RENNA, S.; COTTONE, M.; ORLANDO, A. Optimization of the treatment with immunosuppressants and biologics in inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 29, p. 9675-90, Aug 2014. ISSN 2219-2840. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25110407> >.
- <sup>15</sup> DASTYCH, M.; NOVOTNÁ, H.; CÍHALOVÁ, J. Lactulose/mannitol test and specificity, sensitivity, and area under curve of intestinal permeability parameters in patients with liver cirrhosis and Crohn's disease. **Dig Dis Sci**, v. 53, n. 10, p. 2789-92, Oct 2008. ISSN 0163-2116. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18320320> >.

- 16 SPEIGHT, R. A.; MANSFIELD, J. C. Drug advances in inflammatory bowel disease. **Clin Med**, v. 13, n. 4, p. 378-82, Aug 2013. ISSN 1470-2118. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23908509> >.
- 17 BEPPU, T. et al. Mucosal healing of ileal lesions is associated with long-term clinical remission after infliximab maintenance treatment in patients with Crohn's disease. **Dig Endosc**, May 2014. ISSN 1443-1661. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24833527> >.
- 18 FISCHER, A. et al. Adalimumab prevents barrier dysfunction and antagonizes distinct effects of TNF- $\alpha$  on tight junction proteins and signaling pathways in intestinal epithelial cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 304, n. 11, p. G970-9, Jun 2013. ISSN 1522-1547. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23538493> >.
- 19 VERMEIRE, S.; VAN ASSCHE, G.; RUTGEERTS, P. Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? **Gut**, v. 55, n. 3, p. 426-31, Mar 2006. ISSN 0017-5749. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16474109> >.
- 20 JUDD, T. A. et al. Update of fecal markers of inflammation in inflammatory bowel disease. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 26, n. 10, p. 1493-9, Oct 2011. ISSN 1440-1746. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21777275> >.
- 21 SOUZA, M. H. L. P. et al. Evolução da ocorrência (1980-1999) da doença de Crohn e da retocolite ulcerativa idiopática e análise das suas características clínicas em um hospital universitário do sudeste do Brasil. **Arq Gastroenterol**, v. 39, n. 2, p. 8, 2002.
- 22 SILVERBERG, M. S. et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. **Can J Gastroenterol**, v. 19 Suppl A, p. 5A-36A, Sep 2005. ISSN 1916-7237. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16151544> >.
- 23 BERGMAN, R.; PARKES, M. Systematic review: the use of mesalazine in inflammatory bowel disease. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 23, n. 7, p. 841-55, Apr

2006. ISSN 0269-2813. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16573787> >.
- 24 SU, J. W.; MA, J. J.; ZHANG, H. J. Use of antibiotics in patients with Crohn's disease: A systematic review and meta-analysis. **J Dig Dis**, Nov 2014. ISSN 1751-2980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25421072> >.
- 25 NIKFAR, S.; MIRFAZAEIAN, H.; ABDOLLAHI, M. Efficacy and tolerability of immunoregulators and antibiotics in fistulizing Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis of placebo-controlled trials. **Curr Pharm Des**, v. 16, n. 33, p. 3684-98, 2010. ISSN 1873-4286. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21143147> >.
- 26 SATSANGI, J. et al. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. **Gut**, v. 55, n. 6, p. 749-53, Jun 2006. ISSN 0017-5749. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16698746> >.
- 27 SOSTEGNI, R. et al. Review article: Crohn's disease: monitoring disease activity. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 17 Suppl 2, p. 11-7, Jun 2003. ISSN 0269-2813. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12786607> >.
- 28 MOUM, B.; HOVDE, Ø.; HØIVIK, M. L. What Have We Learnt about the Role of the Environment and Natural Course of IBD in the New Millennium? 20-Year Follow-Up of the IBSEN Cohort. **Dig Dis**, v. 32 Suppl 1, p. 2-9, 2014. ISSN 1421-9875. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25531347> >.
- 29 STRACHAN, D. P. Hay fever, hygiene, and household size. **BMJ**, v. 299, n. 6710, p. 1259-60, Nov 1989. ISSN 0959-8138. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2513902> >.
- 30 SCALDAFERRI, F.; FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: progress and current concepts of etiopathogenesis. **J Dig Dis**, v. 8, n. 4, p. 171-8, Nov 2007. ISSN 1751-2972. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17970872> >.



- 31 HANAUER, S. B. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. **Inflamm Bowel Dis**, v. 12 Suppl 1, p. S3-9, Jan 2006. ISSN 1078-0998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16378007> >.
- 32 BRANT, S. R. Promises, delivery, and challenges of inflammatory bowel disease risk gene discovery. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 11, n. 1, p. 22-6, Jan 2013. ISSN 1542-7714. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23131344> >.
- 33 SCHIRBEL, A.; FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: Established and evolving considerations on its etiopathogenesis and therapy. **J Dig Dis**, v. 11, n. 5, p. 266-76, Oct 2010. ISSN 1751-2980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20883422> >.
- 34 TURNER, J. R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 11, p. 799-809, Nov 2009. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19855405> >.
- 35 MACDONALD, T. T. et al. Tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma production measured at the single cell level in normal and inflamed human intestine. **Clin Exp Immunol**, v. 81, n. 2, p. 301-5, Aug 1990. ISSN 0009-9104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2117510> >.
- 36 ZEISSIG, S. et al. Downregulation of epithelial apoptosis and barrier repair in active Crohn's disease by tumour necrosis factor alpha antibody treatment. **Gut**, v. 53, n. 9, p. 1295-302, Sep 2004. ISSN 0017-5749. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15306588> >.
- 37 TRAVIS, S.; MENZIES, I. Intestinal permeability: functional assessment and significance. **Clin Sci (Lond)**, v. 82, n. 5, p. 471-88, May 1992. ISSN 0143-5221. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1317756> >.
- 38 BJARNASON, I.; MACPHERSON, A.; HOLLANDER, D. Intestinal permeability: an overview. **Gastroenterology**, v. 108, n. 5, p. 1566-81, May 1995. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7729650> >.

- 39 PEETERS, M. et al. Increased permeability of macroscopically normal small bowel in Crohn's disease. **Dig Dis Sci**, v. 39, n. 10, p. 2170-6, Oct 1994. ISSN 0163-2116. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7924738> >.
- 40 HOLLANDER, D. Crohn's disease--a permeability disorder of the tight junction? **Gut**, v. 29, n. 12, p. 1621-4, Dec 1988. ISSN 0017-5749. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3065154> >.
- 41 ARNOTT, I. D.; KINGSTONE, K.; GHOSH, S. Abnormal intestinal permeability predicts relapse in inactive Crohn disease. **Scand J Gastroenterol**, v. 35, n. 11, p. 1163-9, Nov 2000. ISSN 0036-5521. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11145287> >.
- 42 NOTH, R. et al. Anti-TNF- $\alpha$  antibodies improve intestinal barrier function in Crohn's disease. **J Crohns Colitis**, v. 6, n. 4, p. 464-9, May 2012. ISSN 1876-4479. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22398062> >.
- 43 MAXTON, D. G.; CATT, S. D.; MENZIES, I. S. Combined assessment of intestinal disaccharidases in congenital asucrasia by differential urinary disaccharide excretion. **J Clin Pathol**, v. 43, n. 5, p. 406-9, May 1990. ISSN 0021-9746. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2370309> >.
- 44 HOLLANDER, D. The intestinal permeability barrier. A hypothesis as to its regulation and involvement in Crohn's disease. **Scand J Gastroenterol**, v. 27, n. 9, p. 721-6, Sep 1992. ISSN 0036-5521. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1411276> >.
- 45 PEYRIN-BIROULET, L. et al. Clinical disease activity, C-reactive protein normalisation and mucosal healing in Crohn's disease in the SONIC trial. **Gut**, v. 63, n. 1, p. 88-95, Jan 2014. ISSN 1468-3288. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23974954> >.
- 46 SIPPONEN, T. Diagnostics and Prognostics of Inflammatory Bowel Disease with Fecal Neutrophil-Derived Biomarkers Calprotectin and Lactoferrin. **Digestive Disease**, v. 31, p. 336-344, 2013.

- 47 ROSETH, A. G.; AADLAND, E.; GRZYB, K. Normalization of faecal calprotectin: a predictor of mucosal healing in patients with inflammatory bowel disease. **Scand J Gastroenterol**, v. 39, n. 10, p. 1017-20, Oct 2004. ISSN 0036-5521. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15513345> >.
- 48 LEHMANN, F. S.; BURRI, E.; BEGLINGER, C. The role and utility of faecal markers in inflammatory bowel disease. **Therap Adv Gastroenterol**, v. 8, n. 1, p. 23-36, Jan 2015. ISSN 1756-283X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25553077> >.
- 49 LAMB, C. A. et al. Faecal calprotectin or lactoferrin can identify postoperative recurrence in Crohn's disease. **Br J Surg**, v. 96, n. 6, p. 663-74, Jun 2009. ISSN 1365-2168. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19384912> >.
- 50 BEST, W. R. et al. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. **Gastroenterology**, v. 70, n. 3, p. 439-44, Mar 1976. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1248701> >.
- 51 ANANTHAKRISHNAN, A. N. Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Diseases: A Review. **Dig Dis Sci**, Sep 2014. ISSN 1573-2568. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25204669> >.
- 52 JOHN, L. J.; FROMM, M.; SCHULZKE, J. D. Epithelial barriers in intestinal inflammation. **Antioxid Redox Signal**, v. 15, n. 5, p. 1255-70, Sep 2011. ISSN 1557-7716. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21294654> >.
- 53 NOGUEIRA, I. M. et al. Assessment of the response of patients with Crohn's disease to biological therapy using new non-invasive markers: lactoferrin and calprotectin. **Arq Gastroenterol**, v. 50, n. 2, p. 130-7, Apr 2013. ISSN 1678-4219. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23903623> >.
- 54 SIPPONEN, T. et al. Fecal calprotectin, lactoferrin, and endoscopic disease activity in monitoring anti-TNF-alpha therapy for Crohn's disease. **Inflamm Bowel Dis**, v. 14, n.

10, p. 1392-8, Oct 2008. ISSN 1536-4844. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18484671> >.

55 D'HAENS, G. et al. Endoscopic and histological healing with infliximab anti-tumor necrosis factor antibodies in Crohn's disease: A European multicenter trial. **Gastroenterology**, v. 116, n. 5, p. 1029-34, May 1999. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10220494> >.

56 WYATT, J. et al. Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. **Lancet**, v. 341, n. 8858, p. 1437-9, Jun 1993. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8099141> >.

## 9 ANEXOS

### ANEXO 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você, \_\_\_\_\_, paciente do Hospital das Clínicas, foi selecionado e está sendo convidado para participar de um projeto de pesquisa. Antes de aceitar você tem o direito de saber como será sua participação.

O objetivo dessa pesquisa é avaliar a influência do Infiximabe ou do Adalimumabe (de acordo com a terapêutica proposta pela equipe do Instituto Alfa de Gastroenterologia) no processo inflamatório intestinal e na recuperação da barreira intestinal de pacientes com doença de Crohn, utilizando-se o teste de permeabilidade intestinal e a dosagem de calprotectina fecal.

Sua participação nesse estudo é voluntária e gratuita. Você tem a liberdade de se recusar a participar do estudo, ou, se aceitar participar, de retirar seu consentimento a qualquer momento. Este fato não implica na interrupção de seu atendimento, que está assegurado.

Sua participação constituirá em permitir que informações sobre a sua doença sejam utilizadas na pesquisa. Caso você participe, será necessário colher urina durante cinco horas, após a ingestão de um suco contendo lactulose e manitol em doses subterapêuticas para a realização do teste de permeabilidade intestinal. Procedimento que será realizado em duas ocasiões. Será necessário também o fornecimento de duas amostras de fezes, colhidas nos mesmos dias dos testes de Permeabilidade Intestinal, para realização da dosagem da calprotectina fecal.

Os resultados da pesquisa serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a identificação individual dos participantes, garantindo assim, a confidencialidade dos dados.

Os médicos da equipe do Ambulatório de Intestino do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG poderão ser contatados nos telefones 3409-9403 e 3409-9490 e são responsáveis pelo seu tratamento. O telefone do Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais é 3409-4592.

EU, \_\_\_\_\_ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidado a participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento com o meu médico. Eu entendi o que posso fazer durante o tratamento e sei que qualquer problema relacionado ao tratamento será abordado por um dos médicos da equipe, sem ônus para mim.

Eu, \_\_\_\_\_, registro número \_\_\_\_\_ no Hospital das Clínicas da UFMG, após esclarecido sobre a pesquisa, aceito a participar do estudo, concordando com o uso, na pesquisa, das informações clínicas e laboratoriais da minha doença.


ASSINATURA DO VOLUNTÁRIO \_\_\_\_\_

NOME DO PESQUISADOR \_\_\_\_\_

ASSINATURA DO PESQUISADOR \_\_\_\_\_

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

**ANEXO 2 - Cartão de CDAI utilizado pelos pacientes**

<b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</b>							
<b>HOSPITAL DAS CLÍNICAS</b>							
Serviço de Gastroenterologia, Nutrição, Cirurgia Geral e do Aparelho Digestivo (GEN-CAD)							
							
<b>Cartão do paciente para acompanhamento - CDAI</b>							
PACIENTE: _____							
DATA ____ / ____ / ____				REGISTRO _____			
Registra os dados observados nos 7 dias seguintes a consulta							
Data							
1-Número de evacuações com fezes líquidas ou líqu-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).							

**ANEXO 3 Projeto aprovado pelo COEP em 05 de abril de 2010. Parecer no. ETIC 0014.0.203.000-10**



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

**Parecer nº. ETIC 0014.0.203.000-10**

**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 05 de abril de 2010, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Avaliação da Barreira Intestinal, por meio do Teste de Permeabilidade, em pacientes com Doença de Crohn moderada-grave, em resposta ao tratamento com infliximabe e corticosteróides"** 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.

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



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO**

**UFMG**

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA NA BARREIRA INTESTINAL, POR MEIO DO TESTE DE PERMEABILIDADE, EM PACIENTES COM DOENÇA DE CROHN, EM RESPOSTA AO TRATAMENTO COM TERAPIA BIOLÓGICA (ANTICORPOS ANTI-TNF ALFA)**

**GABRIELA SANTANA ATALIBA**

Dissertação 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 Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, área de concentração CIÊNCIAS APLICADAS AO APARELHO DIGESTIVO.

Aprovada em 16 de outubro de 2015, pela banca constituída pelos membros:

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

*Eduardo Garcia Vitela*  
 Prof. Eduardo Garcia Vitela - Coorientador  
 UFMG

*Luciana Costa Faria*  
 Prof. Luciana Costa Faria  
 UFMG

*Júlio Maria Fonseca Chebli*  
 Prof. Júlio Maria Fonseca Chebli  
 UFJF

Belo Horizonte, 16 de outubro de 2015.





UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO  
ADULTO

UFMG

## ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA GABRIELA SANTANA ATALIBA

Realizou-se, no dia 16 de outubro de 2015, às 14:00 horas, Sala 062, andar térreo da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada **AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA NA BARREIRA INTESTINAL, POR MEIO DO TESTE DE PERMEABILIDADE, EM PACIENTES COM DOENÇA DE CROHN, EM RESPOSTA AO TRATAMENTO COM TERAPIA BIOLÓGICA (ANTICORPOS ANTI-TNF ALFA)**, apresentada por **GABRIELA SANTANA ATALIBA**, número de registro 2012731869, graduada no curso de FARMACIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, à seguinte Comissão Examinadora: Prof.ª Maria de Lourdes de Abreu Ferrari - Orientadora (UFMG), Prof. Eduardo Garcia Vilela - Coorientador UFMG), Prof.ª Luciana Costa Faria (UFMG), Prof. Júlio Maria Fonseca Chebli (UFJF).


A Comissão considerou a dissertação:

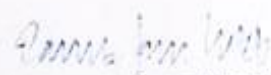
Aprovada

Reprovada

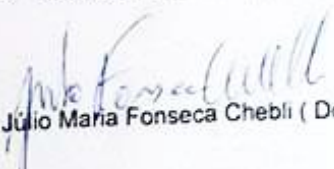
Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 16 de outubro de 2015.

  
Prof.ª Maria de Lourdes de Abreu Ferrari (Doutora)

  
Prof. Eduardo Garcia Vilela (Doutor)

  
Prof.ª Luciana Costa Faria (Doutora)

  
Prof. Júlio Maria Fonseca Chebli (Doutor)