

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**A influência do *Saccharomyces boulardii* na  
permeabilidade intestinal de pacientes com doença de Crohn  
em  
fase de remissão**

**EDUARDO GARCIA VILELA**

**BELO HORIZONTE**

**2005**

**EDUARDO GARCIA VILELA**

**A influência do *Saccharomyces boulardii* na  
permeabilidade intestinal de pacientes com doença de Crohn  
em fase de remissão**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Medicina, Área de Concentração Gastroenterologia, da  
Faculdade de Medicina da UFMG, como requisito  
parcial à obtenção do Título de Doutor em Medicina  
Área de concentração: Gastroenterologia**

**Orientador: Prof. Dr. Aloísio Sales da Cunha**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**BELO HORIZONTE**

**2005**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

Reitora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Ana Lúcia de Almeida Gazzola

Vice-Reitor: Prof. Dr. Marcos Borato Vianna

Pró-Reitor da Pós-Graduação: Prof. Dr. Jaime Arturo Ramirez

**FACULDADE DE MEDICINA**

Diretor: Prof. Dr. Geraldo Brasileiro Filho

Vice-Diretor: Prof. Dr. Joel Alves Lamournier

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Dr. Francisco José

Penna

**DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA**

Chefe: Prof. Ciro José Buldrini Filogônio

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA****ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM GASTROENTEROLOGIA****COLEGIADO:**

Prof. Dr. Marco Túlio Costa Diniz (Coordenador)

Prof. Dr. Luiz Gonzaga Vaz Coelho (Sub-Cordenador)

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luciana Dias Moretzsohn

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cláudia Alves Couto

**Representante discente:**

Ivan René Viana Omonte

**TRABALHO REALIZADO COM SUPORTE FINANCEIRO  
DAS INSTITUIÇÕES:**

- CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível superior,  
através do programa PROF;
- CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo  
auxílio de uma Bolsa de Iniciação Científica;
- Merck S.A. Indústrias Químicas, na pessoa do Dr. Antônio Carlos C. S.  
Moraes, da Gerência de Relações Médicas e Assuntos Regulatórios, Rio de  
Janeiro, RJ.





“O imperfeito conhecimento humano talvez seja uma rua esburacada, porém é o único caminho para sabedoria que vale a pena trilhar.”

Salman Rushdie

Dedico esta tese a minha esposa  
Fabiana, ao meu filho Bruno, aos  
meus pais e ao meu tio Marcos.



## AGRADECIMENTOS

Durante a residência médica conheci o Professor Aloísio Sales da Cunha. Na ocasião, ingressei ao Ambulatório de Intestino do Instituto Alfa de Gastroenterologia. O convívio com o Prof. Aloísio Sales da Cunha e com a Prof<sup>a</sup>. Maria de Lourdes de Abreu Ferrari despertou em mim o interesse pelo estudo das doenças intestinais. Fizemos alguns trabalhos juntos e apresentei minha dissertação de Mestrado em Doença Celíaca em 2001, com a inestimável ajuda dos mesmos. Nesse período, conheci o Prof. Henrique Osvaldo da Gama Torres e juntos dedicamos ao estudo da permeabilidade intestinal. Com a ajuda do Prof. José Renan da Cunha Melo começamos a trabalhar com um aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Performance. Após inúmeras reuniões e extensas horas de trabalho e pesquisa adquirimos o material necessário para realização das dosagens da lactulose e do manitol. Como se trata de um exame que não existe uma padronização e cada laboratório o faz de modo diferente, desenvolvemos nossa própria metodologia. Nesta fase difícil, em que por várias vezes pensei em desistir, pude contar com o apoio e o incentivo paternal do Prof. Aloísio Sales da Cunha. O aparelho por muitos anos não foi utilizado e o tempo até conseguirmos a curva adequada de calibração foi longo e árduo. Algumas vezes necessitamos de peças de reposição que não encontrávamos no Brasil e, com isso, o desgaste era maior. Por mais de dois anos estivemos envolvidos na aquisição de material e peças para realização dos exames. Em Agosto de 2004, conseguimos nosso primeiro cromatograma, utilizando uma metodologia não descrita por qualquer pesquisador. A partir desta data, já fizemos mais de 300 exames e estudamos a permeabilidade intestinal em indivíduos saudáveis, em pacientes com doença celíaca, doença de Crohn e em pacientes submetidos ao transplante de medula óssea. Atualmente o grupo conta com a coordenação do Prof. Aloísio Sales da Cunha, que cuida de toda a parte operacional para que continuemos a

realização dos exames, com a participação da Prof<sup>a</sup>. Maria de Lourdes de Abreu Ferrari, maior estudiosa em doenças intestinais no nosso meio e autora da idéia deste trabalho, e com o Prof. Henrique Osvaldo da Gama Torres, pioneiro no estudo da permeabilidade intestinal através da dosagem do <sup>51</sup>CrEDTA e quem sempre ajudou com observações e críticas construtivas. A estas pessoas devo meu crescimento profissional e acadêmico. Sem eles este estudo não seria possível. Meu avô Saturnino, quem sempre me educou e com ele aprendi a trilhar o caminho correto, certa vez comentou: “a gratidão é uma dívida que não se paga, é eterna.” Muito obrigado por tudo.

Ao Prof. Eugênio Goulart Andrade, que mais uma vez teve paciência e disponibilidade ímpar no tratamento estatístico deste estudo.

Aos acadêmicos de pesquisa, Bolsistas de Iniciação Científica, Ademar Guerra Pinto, Ana Carolina Carneiro Aguirre e Marcelo Hugo C. Souza, pela disponibilidade e dedicação na coleta de material e na realização dos exames.

Gostaria de agradecer também a todas as pessoas que de uma forma ou de outra ajudaram na realização deste trabalho, especialmente, aos médicos integrantes do ambulatório de intestino, Célio Jefferson Salgado, Rodrigo César de Carvalho e Clarissa Carvalho Resende.

Por fim, a Universidade Federal de Minas Gerais que me acolheu como estudante do curso de graduação em Medicina, como médico residente, como estudante de pós-graduação (nível de Mestrado e Doutorado), e hoje, como médico oficialmente e, de modo exclusivo, vinculado a ela, meu muito obrigado.

## SUMÁRIO

1 –INTRODUÇÃO.....	21
2 – OBJETIVOS.....	30
2.1 – Geral.....	31
2.2 – Específicos.....	32
3 – FUNDAMENTO TEÓRICO. REVISÃO DA LITERATURA.....	32
3.1 – Permeabilidade intestinal.....	33
3.1.1 – Perspectiva histórica.....	35
3.1.2 – Rotas de permeação.....	37
3.1.2.1 – Via paracelular.....	38
3.1.2.2 – Via transcelular.....	39
3.1.3 – Métodos para avaliação da permeabilidade intestinal.....	41
3.1.4 – Aplicações clínicas.....	45
3.1.5 – Doença de Crohn e permeabilidade intestinal.....	47
4 – CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	51
4.1 – Casuística.....	52
4.1.1 – Substâncias submetidas ao ensaio.....	54
4.2 – Métodos.....	55
4.2.1 – Teste de permeabilidade intestinal.....	55
4.2.2 – Estatística.....	61
4.2.3 – Ética.....	62
5- RESULTADOS.....	63
6- DISCUSSÃO.....	74
6.1- Critérios utilizados para o diagnóstico e a remissão da DC.....	76
6.2- Critérios utilizados na randomização dos grupos.....	79
6.3- Critérios utilizados para a exclusão de pacientes.....	80
6.4- Resultados do teste de permeabilidade intestinal em indivíduos sadios e em pacientes com DC em fase de remissão.....	82
6.5- Aspectos relativos ao estudo da permeabilidade intestinal e ao uso de probiótas na DC.....	85
7- CONCLUSÕES.....	98
8 – PROPOSTA DE ESTUDO.....	100
9- REFERÊNCIAS.....	102

10-ANEXOS.....116

## LISTA DE ABREVIATURAS

- A – idade
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- A1 – idade inferior a 40 anos
- A2 – idade superior a 40 anos
- Anti-FTN- $\alpha$  – anticorpo contra fator de necrose tumoral alfa
- B - comportamento
- B1 – não penetrante, não estenosante
- B2 – estenosante
- B3 - penetrante
- CDAI – índice de atividade da doença de Crohn
- Da – Dáltons
- DC – Doença de Crohn
- $^{51}\text{Cr-EDTA}$  – etilenodiaminotetraacetato marcado com cromo radioativo
- F – força do cálculo estatístico-
- FNT- $\alpha$  – fator de necrose tumoral alfa
- h - hora
- HCUFGM – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais
- HPLC – cromatografia líquida de alta performance
- Htc - hematócrito
- IAG – Instituto Alfa de Gastroenterologia
- ICAM-1 – molécula 1 de adesão celular
- IL-1 - interleucina-1
- IL-2 – interleucina-2
- IL-4 – interleucina-4
- IL-5 – interleucina-5
- IL-10 – interleucina-10
- L - localização
- L1 – íleo terminal
- L2 – cólon
- L3 – íleo e cólon
- L4 – trato gastrointestinal superior

n – número da amostra  
PCR – proteína C reativa  
PEG – Polietilenoglicol  
R – coeficiente de correlação  
 $r^2$  – coeficiente de determinação  
 $^{99}\text{Tc-DTPA}$  –  $^{99}$ tecnécio-diethylenetriaminopente-acetato  
Th1 – células T auxiliares 1  
Th2 – células T auxiliares 2  
T0 – imediatamente antes do início do tratamento  
T1 – um mês após início do tratamento  
T3 – três meses após o início do tratamento  
UFC - unidades formadoras de colônias  
VHS – Velocidade de Hemossedimentação em uma hora

## LISTA DE TABELAS

<u>Tabela 1.</u> Marcadores intestinais, seus pesos moleculares e as taxas de permeação intestinal em indivíduos sadios após ingestão oral em amostras de urina de 5 horas .	43
<u>Tabela 2.</u> Índice de Atividade da Doença de Crohn (CDAI).....	52
<u>Tabela 3.</u> Classificação de Viena da Doença de Crohn.....	53
<u>Tabela 4.</u> Resultados da randomização do tratamento entre o grupo Placebo e o grupo <i>S. boulardii</i> nos pacientes com DC, realizada com base na classificação de Viena.....	65
<u>Tabela 5.</u> Resultados da randomização dos grupos Placebo e <i>S. boulardii</i> com base nos medicamentos utilizados na fase de remissão da DC.....	66
<u>Tabela 6.</u> Comparação entre as medianas das porcentagens de excreção da lactulose, porcentagem de excreção do manitol e relação entre a taxa de excreção da lactulose e do manitol imediatamente antes do início do tratamento.....	67
<u>Tabela 7.</u> Comparação do teste de permeabilidade intestinal entre voluntários saudáveis e pacientes com DC em fase de remissão antes do início do tratamento .....	68
<u>Tabela 8.</u> Resultados das taxa de excreção da lactulose, do manitol e da relação entre ambos nos grupo Placebo e <i>S. boulardii</i> , em T0, T1 e T3. ....	68
<u>Tabela 9.</u> Comparação entre as diferenças das médias das porcentagens de excreção da lactulose nos pacientes com doença de Crohn submetidos ao tratamento com <i>S. boulardii</i> e o placebo por um período de três meses.....	69
<u>Tabela 10.</u> Comparação entre as diferenças das médias da porcentagem de excreção do manitol nos pacientes com DC submetidos ao tratamento com <i>S. boulardii</i> e o Placebo por um período de três meses. ....	70
<u>Tabela 11.</u> Comparação entre as diferenças das médias da taxa de excreção entre a lactulose e o manitol nos pacientes com DC submetidos ao tratamento com <i>S. boulardii</i> e o Placebo por um período de três meses. ....	71
<u>Tabela 12.</u> Correlação entre a porcentagem de excreção da lactulose e a taxa de excreção entre a lactulose e o manitol e o escore de pontos do CDAI e correlação entre a média da diferença dos seus valores entre T3 e T0 também foram comparados com a média da diferença de pontos do CDAI entre T3 e T0. ....	72

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho esquemático que ilustra a teoria de vias de permeação diferentes e a via única de permeação utilizando as junções firmes. .... 38

Figura 2. Fotografia do aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Performance no Laboratório de Pesquisa do IAG. .... 57

Figura 3. Diagrama que ilustra de modo esquemático as etapas necessárias para a mensuração da lactulose e do manitol no HPLC. Enquanto ocorre a fase móvel proporcionada pela passagem da solução de ácido fosfórico a 0,1% pelo aparelho, o controlador aciona o auto-injetor, para que as substâncias que serão medidas tenham o mesmo fluxo que o ácido fosfórico através da pré-coluna e coluna e, em seguida, percorra até detector que opera por índice de refração. As leituras do detector são interpretadas pela “workstation” através de elementos gráficos que analisarão as áreas sob as curvas. .... 58

Figura 4. Ilustração do gráfico que representa a equação da reta da lactulose. A partir de concentrações conhecidas de lactulose, obtinha-se os valores numéricos das áreas sob as curvas, o que proporcionou a elaboração da equação  $y = ax + b$ , onde y representa a área sob a curva e x representa a concentração da lactulose. .... 59

Figura 5. Ilustração do gráfico que representa a equação da reta do manitol. A partir de concentrações conhecidas de manitol, obtinha-se os valores numéricos das áreas sob as curvas, o que proporcionou a elaboração da equação  $y = ax + b$ , onde y representa a área sob a curva e x representa a concentração do manitol. .... 59

Figura 6. No gráfico está representada a área sob a curva da lactulose no valor de 725958, situada no tempo de retenção 12,271 minutos. Este valor numérico da lactulose representa o valor de y na equação da reta e, por conseguinte, temos o valor de x que é igual a 3,75 em g/L. Obtido este valor de x, aplica-se a fórmula:

$$\frac{3,75 \times 560/1000}{6} \times 100 = 35\% \text{ (taxa de excreção da lactulose)}$$

Para o manitol, o procedimento é o mesmo. A área sob a curva é de 208910 que apareceu no tempo de retenção de 14,335 minutos. Este valor representa o y para o manitol e, como temos a equação da reta, concluímos que o valor de x é igual a 1,2g/L. Na fórmula:

$$\frac{1,2 \times 560/1000}{3} \times 100 = 22,4\% \text{ (taxa de excreção do manitol)}$$

Por fim a relação de excreção: 1,56 ..... 61

Figura 7. Representação gráfica do comportamento da porcentagem de excreção da lactulose em pacientes com DC no grupo Placebo e no grupo *S. boulardii* durante três meses de tratamento. .... 69



Figura 8. Representação gráfica do comportamento da porcentagem de excreção do manitol em pacientes com DC em uso do Placebo e do *S.boulardii* durante três meses de tratamento. ....70

Figura 9. Representação gráfica do comportamento da taxa de excreção entre a lactulose e o manitol em pacientes com DC em uso do Placebo e do *S. boulardii* durante três meses de tratamento. ....71

## **LISTA DE ANEXOS**

Anexo 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Para pacientes)

Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Para voluntários)

Anexo 3 – Protocolo de Doença de Crohn

Anexo 4 - Folha de acompanhamento dos pacientes

Anexo 5 - Dados obtidos através do preenchimento dos protocolos

## RESUMO

A doença de Crohn (DC) é uma afecção caracterizada por uma inflamação crônica recorrente, que pode acometer qualquer sítio do trato digestivo. Um dos principais objetivos terapêuticos é a prevenção da recidiva. Entre os fatores etiológicos, destaca-se a diminuição da integridade da mucosa, que permite a apresentação de antígenos ao sistema imune da mucosa, determinando o início ou a manutenção do processo inflamatório. Sugere-se que a administração de probiótas pode exercer efeito benéfico sob a flora intestinal e, conseqüentemente melhorar a função de barreira exercida pela mucosa intestinal. É objetivo desse estudo avaliar a influência do *S. boulardii* na permeabilidade intestinal de pacientes com DC em fase de remissão. Foram incluídos 34 pacientes, divididos em dois grupos, randomizados a partir da Classificação de Viena. Para o primeiro grupo foi administrado o Placebo e para o segundo grupo foi administrado o *S. boulardii*. As medicações utilizadas na fase de remissão foram mantidas. O teste de permeabilidade intestinal foi realizado imediatamente antes do início do tratamento, no final do primeiro e do terceiro mês de tratamento, nos pacientes com doença de Crohn. Onze voluntários saudáveis também se submeteram à realização do exame. Neste grupo, a mediana da porcentagem de excreção da lactulose foi de 2,56%, do manitol foi de 23% e a relação de excreção entre os mesmos foi de 0,1. Quando comparados com os resultados nos pacientes com DC, o valor de p foi de 0,002 para lactulose, 0,58 para o manitol e 0,016 para a relação entre os mesmos. Para avaliar a influência do *S. boulardii* na permeabilidade intestinal, foi realizada a comparação entre as médias das diferenças das porcentagens da lactulose, do manitol e da relação entre ambos. No grupo Placebo, a porcentagem de excreção inicial da lactulose foi de 16,3% e no final do terceiro mês foi de 20,13% (p = 0,16); a

porcentagem de excreção do manitol foi de 21,14% antes do tratamento e de 21,93% no final ( $p= 0,39$ ) e a relação entre a excreção dos mesmos foi de 0,79 no início e de 0,935 no final ( $p= 0,164$ ). Com relação ao grupo *S. boulardii*, os resultados foram de 19,88% e 16,04% para lactulose ( $p=0,017$ ), 21,42% e 20,82% para o manitol ( $p= 0,49$ ) e 0,95 e 0,775 para relação entre ambos ( $p= 0,011$ ). Quando foi comparado com o CDAI, os valores de  $r^2$  foram menores que 0,1. Apenas uma paciente apresentou reativação da doença e pertencia ao grupo Placebo ( $p>0,05$ ). Assim, pode-se concluir que os pacientes com DC em fase de remissão apresentam alterações importantes da integridade da mucosa intestinal; o *S. boulardii* melhorou a permeabilidade intestinal desses pacientes, mas não a normalizou; o comportamento do teste de permeabilidade intestinal não se correlacionou com o CDAI e a utilização do *S. boulardii* não influenciou no comportamento clínico da doença no período de acompanhamento.

## ABSTRACT

Crohn's disease (CD) is a condition characterized by a tendency chronic and relapsing inflammation, within the gastrointestinal tract. One of the primary goals of treatment is to maintain remission. Among etiologic factors, increased gut permeability allows presenting antigens to the mucosa immune system, triggering or maintaining inflammation. It has been supposed that probiotics can induce benefic effect in intestinal microflora, and get better barrier function of intestinal mucosa. The aim of the study was to evaluate *S. boulardii* influence in gut permeability of remission CD patients. In double-blinded, placebo-controlled, *S. boulardii* were administered for three months to 31 patients. The maintenance treatment was not interrupted. The intestinal permeability was done immediately before the treatment begin, at the end of the first month and at the end of the third month. Eleven health controls subjects was also submit to the test. In this group, median percentage of lactulose excretion was 2,56%, mannitol excretion was 23% and permeability ratio was 0,1. After comparing with CD patients results, the p value was 0,002 for lactulose, 0,58 for mannitol and 0,016 for permeability ratio. The comparison between medias differences of lactulose excretion, mannitol excretion and permeability ratio, was done in to intend evaluate *S. boulardii* influence in gut permeability. In Placebo group, the initial lactulose excretion was 16,3% and at the end of the third month was 20,13% (p= 0,16); the mannitol excretion was 21,14% in the beginning and 21,93% at the of following period (p= 0,39) and the permeability ratio was 0,79 initially and 0,935 at the end (= 0,164). In the *S. boulardii* group, the results was 19,88% and 16,04% for lactulose (p= 0,017), 21,42% and 20,82% for mannitol (p=0,49) and 0,95 and 0,775 for permeability ratio (p= 0,011). When CDAI score was compared with permeability test,  $r^2$  values was less than 0,1. Only one patient was

relapsed and belongs to Placebo group ( $p > 0,05$ ). Our results suggest that remission CD patients have important intestinal mucosa integrity alterations.; the *S. boulardii* got better intestinal permeability, but did not normalized it; the behavior of intestinal permeability test was not associated with CDAI score and the use of *S. boulardii* did not influence the disease clinical behavior during the following period.

## **1 - INTRODUÇÃO**

## 1 - INTRODUÇÃO

A doença de Crohn (DC) é uma afecção caracterizada por uma inflamação crônica que, potencialmente, pode acometer qualquer sítio do trato digestivo, desde a boca até o ânus, mas com predisposição pela porção final do intestino delgado e a porção proximal do intestino grosso. A inflamação geralmente não é contínua, no entanto, envolve todas as camadas, da mucosa à serosa. Trata-se de uma doença de caráter recorrente e seus principais sintomas são diarreia e dor abdominal, por vezes, acompanhados de perda de peso. Estenoses e fistulas são complicações frequentes e, não raro necessitam de tratamento cirúrgico. Podem ocorrer ainda manifestações extra-intestinais tais como artralgia, esclerite, eritema nodoso e urolitíase. A etiologia não é totalmente compreendida. Inúmeras evidências apontam para a hipótese de que um dos principais fatores implicados na patogênese da DC seja a quebra da integridade da mucosa permitindo a permeação de antígenos<sup>1, 2</sup>. O tratamento é geralmente efetivo no alívio dos sintomas, mas não é curativo. Por ser uma doença crônica, com grande tendência a surtos de reativação, um dos principais objetivos no tratamento da doença de Crohn é a prevenção das recidivas.

A incidência e a prevalência da doença são variáveis. Tanto na Europa quanto na América do Norte, as maiores taxas de incidência são observadas em latitudes mais altas. No norte de Alberta no Canadá e no sudeste da Noruega a incidência anual é de 6 a 10 para cada 100.000 habitantes, respectivamente, enquanto que na Espanha e na Itália as taxas são de 0,9 e 3,4 por 100.000 habitantes<sup>3, 4, 5, 6</sup>. Nos Estados Unidos, a incidência varia de 3,6 a 8,8 por 100.000<sup>7, 8, 9</sup>. No Japão, a incidência é mais baixa e não ultrapassa 0,5 por 100.000<sup>10, 11</sup>. Na Austrália e na Nova Zelândia essas taxas de incidência variam de 1,75 a 2,1<sup>12, 13</sup>. Na África, estima-se que a DC seja extremamente rara, com exceção



da África do Sul onde a taxa de incidência é de 2,6 por 100.000 habitantes<sup>14</sup>. No Brasil, não foram encontrados dados sobre prevalência ou incidência da doença na bibliografia consultada. Apenas um estudo conduzido por Souza *et al*, que avaliaram a frequência de admissão de casos de DC e retocolite ulcerativa em um hospital universitário de Ribeirão Preto entre 1980 e 1999<sup>15</sup>. Nesse período, foram registrados 126 casos novos da doença. No Brasil, três estudos de séries de casos realizados no sudeste, apresentados recentemente em eventos científicos e em revistas especializadas retratam as manifestações clínicas da doença<sup>16, 17, 18</sup>.

Baseado nos achados histopatológicos da DC, acredita-se que a doença seja resultante de uma resposta imunológica sustentada. Questiona-se, entretanto, se existe um patógeno não reconhecido que causa uma resposta inflamatória considerada apropriada ou, se a resposta é inapropriada a um estímulo que, inicialmente, seja inócuo. Experimentos de modelos de doença inflamatória intestinal em animais de laboratório modificados geneticamente sugerem que, em hospedeiros geneticamente predispostos, a flora entérica comensal não patogênica é suficiente para induzir a resposta inflamatória crônica. Quando estes animais são criados em condições sem germes, evidencia-se uma expressão fenotípica diminuída ou retardada<sup>19</sup>.

A luz intestinal é composta por uma diversidade de substâncias e bactérias e, apesar disso, o intestino não se encontra inflamado em indivíduos saudáveis. Um mecanismo de tolerância imunológica representado por uma reação inflamatória de menor intensidade pode justificar achados histológicos considerados normais na mucosa intestinal desses indivíduos. Essa tolerância é mediada em parte por uma subpopulação de linfócitos T auxiliares CD4+ que secretam citocinas regulatórias como fator de crescimento  $\beta_1$  e interleucina-10 (IL-10). Outras duas populações de linfócitos (linfócito

T regulatório 1 e linfócito auxiliar 3) também apresentam essa propriedade em manter a tolerância da mucosa.

Em modelos animais, foi constatada uma resposta anormal das células T à flora intestinal na presença da doença inflamatória intestinal<sup>20</sup>. Quando ocorre um estímulo antigênico e a imunotolerância é quebrada, células T auxiliares 1 (Th1) secretam citocinas pró-inflamatórias (interleucina 2 e interferon- $\gamma$ ). Esta resposta, denominada de Th1, dá suporte a imunidade celular e caracteriza a resposta do tipo hipersensibilidade tardia. Concomitantemente, pode haver estimulação das células T auxiliares 2 (Th2) que evocam a imunidade humoral com a síntese de anticorpos e a secreção de outras citocinas como a interleucina-4 (IL-4) e interleucina-5 (IL-5), caracterizando a resposta Th2<sup>21</sup>. Em hospedeiros saudáveis, a natureza da resposta, Th1 ou Th2, depende das características do patógeno, das células apresentadoras de antígenos e também das características intrínsecas do hospedeiro. Em quaisquer situações onde a reação imunológica não é adequadamente regulada, como na DC, ocorre a resposta inflamatória sustentada. Na maioria dos modelos experimentais a resposta é do tipo Th1<sup>22</sup>.

Em suma, pode-se sintetizar que o processo inflamatório seja iniciado por um componente bacteriano presente na luz intestinal que alcançaria a mucosa, devido à perda da integridade da mucosa. Nessa fase, as células apresentadoras de antígeno incluindo os macrófagos processariam o antígeno dentro do complexo de histocompatibilidade maior e, assim, seriam imediatamente reconhecidos pelos linfócitos T CD4+, causando sua ativação e diferenciação. Tal diferenciação resultaria no aumento das populações de linfócitos Th1, Th2, Th3 e T regulatório 1. Como já foi citado, poderia haver a produção de citocinas regulatórias; no entanto, quando este processo não é adequadamente regulado, os macrófagos estimulados pelo interferon- $\gamma$ ,

sintetizado pelo linfócito Th1, causariam aumento na produção de interleucina-2 (IL-2), fator de necrose tumoral alfa (FNT- $\alpha$ ) e outras citocinas. A IL-2 promoveria a expansão clonal das próprias células T, resistentes a apoptose e, assim, determinantes na perpetuação do processo inflamatório. O fator de necrose tumoral ativaria novos macrófagos e atrairia neutrófilos, responsáveis pela produção de metaloproteinases, mediadores essenciais do dano tissular que aumentam a secreção clorídrica e alteram a permeabilidade das células epiteliais intestinais, induzindo reagentes de fase aguda. Outras células não imunológicas também poderiam modular a resposta imunológica. Os fibroblastos produziram interleucina-1 (IL-1) e neurônios estimulariam a produção de histaminas através de mastócitos e de substância P, ambas com capacidade de aumentar a permeabilidade vascular localmente. Granulócitos e células mononucleares seriam recrutadas devido ao aumento da expressão das moléculas de adesão, como a molécula 1 de adesão intercelular (ICAM-1), induzidas pelo FNT- $\alpha$ . Tais células presentes na mucosa sintetizariam substâncias pró-inflamatórias tais como as prostaglandinas, leucotrienos, proteases e óxido nítrico. Por fim, a cicatrização da mucosa poderia ocorrer como parte de um processo de restituição e reparação do tecido.

Fatores genéticos e ambientais também participam de modo importante na patogênese da doença. A predisposição genética é sugerida, a princípio, pela constatação de que entre familiares de primeiro grau de um paciente com DC, o risco relativo de se desenvolver a doença é cerca de 14 a 15 vezes maior quando comparado com a população geral<sup>23</sup>. Entre gêmeos homozigóticos, a taxa de concordância atinge 67%<sup>24</sup>. Alguns estudos sugerem ainda que existe uma concordância também quando se avalia a localização da doença e seu comportamento, e outros evidenciam que há tendência a manifestação mais precoce da doença na geração que sucede o caso índice familiar<sup>25, 26, 27, 28</sup>. Contudo, a herança genética não está relacionada a desordens

genéticas complexas e tão pouco, a traço mendeliano simples. Acredita-se que existem segmentos cromossômicos que são compartilhados entre membros de uma mesma família. Em estudo realizado por Hugot *et al*, verificou-se que um locus denominado de IBD1, localizado no cromossomo 16, foi encontrado repetitivamente nos pacientes com DC, sugerindo a possibilidade de um gene associado à doença<sup>29</sup>. Posteriormente, dois grupos independentes identificaram o que foi denominado de gene NOD2, localizado no locus IBD1, constatando-se que este gene media a resposta imune inata a patógenos microbianos, levando a ativação do NF- $\kappa$ B<sup>30,31</sup>. Outros locus também são associados à DC, tais como IBD2 no cromossomo 12 e outros nos cromossomos 1p, 1q, 3p, 3q e 7, mas, de modo menos consistente<sup>32,33</sup>.

Com relação aos fatores ambientais, inúmeros estudos epidemiológicos têm evidenciado um aumento na incidência da DC, sugerindo que possa existir uma parcela de contribuição do meio ambiente na expressão da doença. Entre os fatores ambientais estão incluídos a classe econômica mais alta, possivelmente associado a uma menor exposição de antígenos ambientais durante a infância, a utilização de anti-inflamatórios não-esteróides, por aumentar a permeabilidade intestinal, o aumento da ingestão de açúcares refinados, uma dieta pobre em vegetais e ainda o tabagismo. Sabe-se que a DC é mais prevalente entre fumantes e que os fumantes apresentam maior risco de recaída da doença após ressecções cirúrgicas. Já o estresse, sabidamente não causa a doença; no entanto, em experimentos de animais com doença inflamatória intestinal, aqueles sob condições de estresse apresentaram maior número de exacerbações dos processos inflamatórios<sup>34</sup>.

Apesar dos fatores ambientais e genéticos serem objetos de vários estudos, a conexão entre os mesmos e a expressão fenotípica da doença é pouco compreendida. Acredita-se que alterações na integridade da mucosa possam justificar o elo entre estes

dois fatores. O fato é que a presença de um estímulo antigênico (bacteriano) luminal, associado ao aumento da permeabilidade intestinal e a uma resposta imunológica do tipo Th-1 anormal constituem-se em elementos essenciais no processo patogênico da doença. O que não se sabe é se a quebra da integridade do epitélio intestinal é um evento primário ou secundário às alterações imunológicas que favorecem o processo inflamatório da DC. Contudo, reconhece-se que o aumento na permeabilidade intestinal permite o acesso de antígenos no tecido intestinal, possibilitando o início ou mesmo a manutenção da doença<sup>35</sup>.

A DC, como já mencionado, caracteriza-se por ser uma doença crônica, com grande tendência a surtos de reativação. Por isso, um dos principais objetivos do tratamento é a prevenção das recidivas. Os medicamentos utilizados com este objetivo são os derivados do ácido 5-aminosalicílico, a azatioprina e seu metabólito, a 6-mercaptopurina, o metronidazol e, mais recentemente, o infliximabe<sup>36</sup>. Contudo, os resultados a longo prazo não são favoráveis e os pacientes, não raro, são submetidos a doses altas de corticóides por tempo prolongado, o que aumenta consideravelmente a morbidade associada ao tratamento. A sulfasalazina, quando utilizada na manutenção da remissão da DC não demonstrou qualquer benefício, mesmo após situação de ressecções intestinais<sup>37</sup>. Com relação à mesalazina, sua utilização na terapia de manutenção permanece controversa. Em duas meta-análises, a mesalazina foi significativamente mais efetiva em prevenir as recorrências da doença<sup>38, 39</sup>. Entretanto, em outro ensaio clínico utilizando o mesmo medicamento, a mesalazina não aumentou as taxas de remissão da doença<sup>40</sup>. Quando tais estudos foram analisados em conjunto, as recorrências clínicas ocorreram em uma faixa que variou entre 28 e 34%, com seis meses de tratamento e 34 a 58%, com 12 meses de tratamento<sup>41</sup>.

Com referência à azatioprina/6-mercaptopurina, a indicação de sua utilização é reservada, principalmente, para aqueles pacientes cujos surtos de reativação da doença e o uso de corticóides acontecem de modo freqüente, isto é para os pacientes corticóides-dependentes ou mesmo corticóides-resistentes. É considerada uma droga eficaz na manutenção da remissão da doença. Contudo, deve-se considerar os potenciais riscos de uma terapia imunossupressora a longo prazo. Além do mais, os benefícios em se manter tais medicamentos em pacientes que estão em remissão há mais de quatro anos são questionáveis<sup>42</sup>. Já o metronidazol, está indicado apenas para pacientes cuja remissão da doença foi alcançada após o tratamento cirúrgico<sup>43</sup>. No entanto, seu efeito não é duradouro. O metronidazol é eficaz na redução da recorrência da atividade clínica em um ano, mas não em dois e três anos.

Sobre o infliximabe, seu uso na manutenção da remissão requer considerações. Seu custo é elevado e a freqüência de complicações infecciosas não é desprezível. Esquemas terapêuticos com doses em número maior do que três necessitam de melhor avaliação<sup>44</sup>. No entanto, o Infliximabe tem sido usado, com alguns resultados favoráveis, na manutenção da remissão<sup>45, 46</sup>. Assim, torna-se evidente que a terapêutica atual para a prevenção da recorrência da atividade da DC é ainda um desafio na prática clínica.

Tendo em vista que os pacientes com DC apresentam, além de uma alteração da permeabilidade intestinal, determinantes antigênicos na microbiota intestinal, que os antimicrobianos têm sido utilizados não apenas para tratar as complicações da doença, como abscessos e fístulas, mas também para a manutenção da remissão, e que probiótas podem exercer efeito benéfico sob a microbiota, diversas pesquisas enfocam o uso desta terapêutica nas doenças intestinais<sup>47, 48, 49, 50</sup>.

A aplicação de testes não invasivos, como a medida das taxas de excreção urinária de dissacarídeos e monossacarídeos para avaliação da permeabilidade intestinal é realizada há mais de 20 anos. Sua utilização, não somente em pesquisas, mas também na prática clínica é cada vez mais freqüente. Através da avaliação da integridade da mucosa intestinal, pode-se ter acesso ao estudo da patogênese de doenças, à monitorização da resposta ao tratamento, à avaliação de prognóstico não apenas de doenças intestinais, como também de doenças extra-intestinais; e, ainda, pode-se ter acesso ao efeito de drogas e toxinas no intestino<sup>51</sup>. Sobre sua utilização na monitorização da resposta terapêutica, sugere-se que o teste de permeabilidade intestinal permita uma análise de modo mais preciso e sensível que a observação clínica, pois é capaz de avaliar, a nível molecular e estrutural, a consequência das alterações intimamente associadas aos processos fisiopatogênicos presentes na DC<sup>52</sup>.

## **2 - OBJETIVOS**



## **2- OBJETIVOS**

### **2.1 - Geral**

Avaliar a influência do *S. boulardii* na permeabilidade intestinal de pacientes com DC em fase de remissão, quando comparado ao grupo placebo.

### **2.2 - Específicos**

- a) Avaliar a integridade da mucosa intestinal nos pacientes com DC em fase de remissão, definida pelos critérios do CDAI;
- b) avaliar a integridade da mucosa intestinal após o uso do *S. boulardii*;
- c) comparar os resultados do teste de permeabilidade intestinal com os resultados obtidos através da contagem de pontos do CDAI;
- d) avaliar a resposta terapêutica do *S. boulardii* na manutenção da remissão da doença no período de três meses.

**3 – FUNDAMENTO TEÓRICO**  
**REVISÃO DE LITERATURA**

### **3 – FUNDAMENTO TEÓRICO. REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1 - Permeabilidade intestinal**

O epitélio intestinal apresenta diferentes propriedades, promovendo tanto a função de barreira quanto a função de transporte de substâncias existentes na luz intestinal. O termo permeabilidade intestinal relaciona-se à função de barreira exercida pelo epitélio e se traduz pela propriedade que este epitélio apresenta em permitir a passagem de moléculas através do mecanismo de difusão não mediada, independente do gradiente de concentração ou de pressão e sem a assistência de um sistema carreador bioquímico passivo ou ativo<sup>52</sup>. Somente substâncias com peso molecular maior que 150 Dáltons (Da) utilizam essa via de acesso à mucosa intestinal. Por conseqüência, tal conceito não se aplica às moléculas menores, como o sódio ou o cloro, que utilizam sistemas carreadores para seu transporte. A este segundo processo denomina-se absorção<sup>52</sup>.

Sob determinados aspectos pode-se afirmar que a função de barreira exercida pelo epitélio intestinal é dinâmica, pois se altera temporariamente após um estresse hiperosmolar e também é afetada por doenças, drogas, citocinas e hormônios<sup>53</sup>. O resultado dessa alteração é uma maior permeação de antígenos à mucosa intestinal, que podem iniciar ou mesmo perpetuar processos inflamatórios. A possibilidade de se obter informações a respeito de alterações que ocorrem no epitélio intestinal de maneira não invasiva, não apenas para explicar a etiopatogenia de determinadas doenças, mas também para monitorizar medidas terapêuticas, constitui um dos motivos pelos quais se explica o crescente interesse pelo estudo da permeabilidade intestinal.

O trato gastrointestinal constitui-se no maior sítio de exposição de nosso organismo ao meio externo e participa das reações entre os microrganismos presentes na

luz intestinal e o hospedeiro propriamente dito. A adequada manutenção da integridade epitelial exerce papel fundamental contra a patogenicidade exercida por bactérias, toxinas e outras moléculas que podem funcionar como antígenos. Além da barreira exercida pelo epitélio intestinal, outros mecanismos protetores não específicos presentes na luz intestinal e a resposta imunológica às moléculas invasoras constituem-se, também, em linhas de defesa exercidas pelo trato digestivo.

Entre os mecanismos luminais destacam-se a ação exercida pelo suco gástrico ácido e pelas enzimas pancreáticas. O pH do suco gástrico exerce ação bactericida contra vários microrganismos e, as enzimas pancreáticas são capazes de provocar danos às paredes de células bacterianas. Quando ocorre neutralização da acidez gástrica, há aumento na susceptibilidade patogênica a bactérias como, a *Cholera sp* e a *Shigella sp*. Em relação às enzimas pancreáticas, a diminuição de sua secreção, como ocorre na pancreatite crônica, predispõe ao supercrescimento bacteriano<sup>54</sup>. Outros elementos de defesa que atuam neste nível são exercidos pela imunoglobulina A que se liga diretamente a corpos estranhos e pelos fluidos produzidos pelas células das criptas epiteliais que, associado à motilidade intestinal, promovem a varredura de bactérias e toxinas. Existem também outras moléculas como as defensinas, que são secretadas por células da linhagem mielóide e pelas células de Paneth intestinais e atuam diretamente contra as membranas de paredes bacterianas e estimulam a secreção clorídrica nas criptas, eliminando microrganismos invasores e ativando fenômenos quimiotáticos<sup>55, 56</sup>.

A segunda linha de defesa, como foi descrito, é exercida pelo epitélio intestinal, que promove uma barreira física entre a luz intestinal e o hospedeiro. Seu acelerado “turnover” celular contribui para a eliminação de antígenos que aderem à superfície mucosa. Contudo, é o citoesqueleto, estrutura de sustentação do epitélio, que se estende através das porções látero-apicais das células e formam as junções firmes ou zônulas

ocludentes, que permitem ou não a passagem bidirecional de várias substâncias, incluindo células inflamatórias<sup>57, 58</sup>. Esta peculiaridade dá suporte à base racional para o teste de permeabilidade intestinal, utilizado para avaliar a função de barreira exercida pelo epitélio. Tais células inflamatórias bem como outras substâncias como anti-inflamatórios não hormonais e o álcool interferem na resistência destas junções firmes, e promovem o relaxamento desse segmento do citoesqueleto e, desse modo, permitem o acesso de antígenos à mucosa intestinal.

A terceira linha de defesa é constituída pela resposta imunológica. Quando antígenos penetram no epitélio intestinal e alcançam a lâmina própria são identificados por mastócitos, células dendríticas e macrófagos, que os apresenta a células T nativas que, por sua vez, vão se diferenciar em linfócitos T CD4+ e CD8+. As citocinas (IL-2 e IL-4) ativadas por esse processo atuam na expressão das subpopulações Th1 e Th2 dos linfócitos T CD4+ e auxiliam na maturação de linfócitos B, promovendo assim, a produção de anticorpos. Em relação aos linfócitos CD8+, estes vão constituir a população de linfócitos que ocuparão os espaços epiteliais.

### **3.1.1 - Perspectiva histórica**

A idéia de se utilizar marcadores para avaliar a passagem de substâncias através do intestino delgado não é recente. Martin Lister em 1673 e William Musgrave em 1701 introduziram leite misturado com índigo, com massa molecular de 262Da, diretamente no intestino de cães visando recuperar este marcador na secreção das glândulas mamárias; no entanto, somente em 1965 a permeabilidade intestinal foi estudada em seres humanos<sup>59</sup>.

No início da década de 60, Lindeman infundiu soluções hiperosmolares compostas por solutos de peso molecular diferentes e o cálculo do fluxo osmótico de

água foi obtido através da diluição de um marcador não absorvível, o polietilenoglicol (PEG – 4000). Suas evidências foram compatíveis com a hipótese de que a membrana apical dos enterócitos continha poros preenchidos por água e que permitiam a permeação de moléculas polares não-lipídicas. O tamanho médio desses poros ou canais foi calculado a partir de coeficientes de reflexão e apresentavam raio de 0,8nm no jejuno e 0,3nm no íleo distal<sup>60</sup>. O influxo de fluidos induzido pelo gradiente osmótico foi nove vezes maior no jejuno, quando comparado com o íleo, sendo sugerido também que, além de poros maiores, o jejuno apresentava também maior área viável de mucosa e maior incidência desses poros. Tais dados foram confirmados posteriormente por Davis *et al*<sup>61</sup>. Da mesma forma, através do coeficiente de reflexão, foram medidos os índices de resistência à permeação da barreira intestinal a marcadores não-absorvíveis. Estes índices eram inversamente proporcionais à permeabilidade da barreira e variavam de 0 a 1. O índice 0 significava, portanto, permeabilidade infinita. Contudo, este estudo não foi capaz de diferenciar a coexistência de poros de tamanhos variados. Ainda na década de 60, foram evidenciadas várias outras propriedades da barreira epitelial. Farquhar e Palade descreveram os anéis de adesão que conectavam células epiteliais adjacentes e foram denominados de zônula ocludente ou de junções firmes<sup>57</sup>. Ussing e Windhager reconheceram ainda a importância da via paracelular, e sugeriram que as junções intercelulares não seriam necessariamente oclusivas<sup>58</sup>. Através desse estudo, ficou estabelecido que o intestino delgado humano apresentava resistência total pouco inferior a  $1000\text{ohm}/\text{cm}^2$  e que a resistência nas zônulas ocludentes era inferior a 50% da resistência total. Na década seguinte, em 1974, foram introduzidos os termos de firmes e frouxas, caracterizando que o epitélio apresentava níveis de permeabilidades diferentes, traduzidos por variações da resistência elétrica nas zônulas ocludentes. Com relação ao epitélio do intestino grosso, é menos permeável que o epitélio do intestino

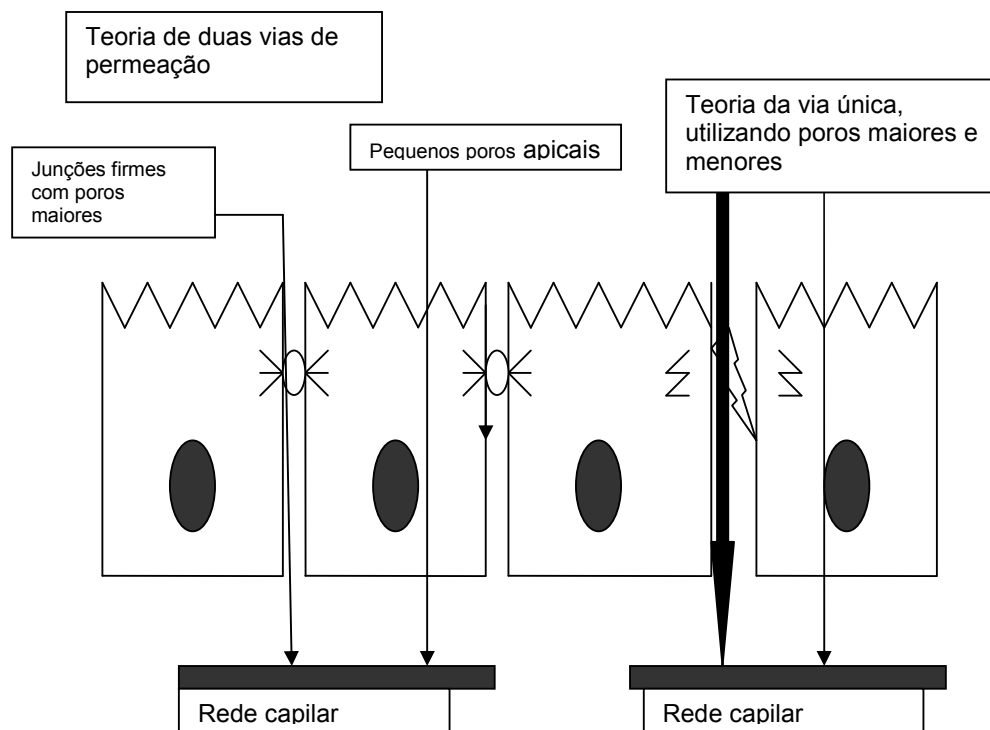
delgado a moléculas polares, insolúveis em lípidos, apresentava valores bem mais elevados de potencial elétrico ao longo de sua superfície<sup>52</sup>.

### 3.1.2 - Rotas de permeação

Acredita-se na existência de duas rotas de permeação através da mucosa intestinal. Na primeira, denominada de transcelular, as moléculas menores do que 0,4nm, como é o caso do manitol e da ranose, atravessam as membranas celulares através de pequenos poros aquosos (0,4 a 0,7nm de raio), de alta incidência, presentes na membrana dos enterócitos. Na segunda, denominada de paracelular, a passagem das moléculas ocorre entre as células. Isso acontece com as moléculas maiores do que 0,5nm, como a lactulose, a celobiose, e o <sup>51</sup> Cr-EDTA, que penetram na mucosa intestinal através de canais aquosos maiores (6,5nm de raio), de baixa incidência, susceptíveis ao estresse hiperosmolar, presentes na junções firmes<sup>52</sup>. Baseado nessa teoria e através de evidências do estudo original de Pappenheimer *et al*, constatou-se que a permeação de moléculas menores seria 20 a 30 vezes maior quando comparado às moléculas maiores<sup>62</sup>. De acordo com essa teoria, os poros menores estariam localizados na membrana apical dos enterócitos. Esta teoria é denominada de teoria das duas vias de permeação (Figura 1).

Contudo, persistem incertezas acerca de qual rota é utilizada por alguns marcadores. Quando se utiliza marcadores de pesos moleculares variados em diferentes gradientes osmóticos constata-se a presença tanto de poros eletroneutros maiores (6,5nm), quanto de poros menores (0,7nm), cátion-seletivos, localizados entre as células epiteliais. Através desse modelo, as moléculas maiores passariam exclusivamente pelos poros maiores através da via paracelular, enquanto as moléculas menores passariam pelos poros maiores e menores, utilizando as vias paracelular e transcelular. Contudo, os

poros maiores contribuiriam pouco para permeação total das moléculas menores<sup>63</sup>. Esta teoria é denominada de teoria da via única (Figura 1). As teorias para explicar as vias de permeação estariam regidas também por leis físicas como a de Graham, na qual a difusão de um soluto qualquer em uma solução aquosa seria proporcional à raiz quadrada de sua massa molecular; e a teoria de Faxén-Ferry, que estabelece que a difusão dos solutos estaria restrita à razão entre o raio da molécula e o raio do poro.



**Figura 1.** Desenho esquemático que ilustra a teoria de vias de permeação diferentes e a via única de permeação utilizando as junções firmes.

### 3.1.2.1 - Via paracelular

Existem várias razões para se acreditar que a via paracelular é a responsável pela passagem de substâncias com peso molecular maior que 180Da como a lactulose, a celobiose, o <sup>51</sup>Cr-EDTA, a rafinose e o dextran. Estas moléculas apresentam uma distribuição exclusivamente extracelular após injeção venosa, presumindo-se 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. Sob o ponto de vista estrutural, as junções circundam as células epiteliais em seu pólo apical, formando um cinturão que conecta as células adjacentes entre si e mantêm a polaridade celular, pois separam as membranas apicais das membranas basolaterais<sup>64</sup>. Esse intervalo entre as células epiteliais mede cerca de 20 nm e é ocupado por feixes de fios constituídos por proteínas, destacando-se a zonulina e a cingulina, visualizadas à microscopia eletrônica<sup>65, 66</sup>. Apesar do número de feixes correlacionar-se com o poder de oclusão da junção, as junções firmes não formam uma cola biológica intransponível entre as células, mas sim um mecanismo ajustável utilizado por substâncias que podem alcançar ou não a mucosa intestinal através da via paracelular<sup>67, 68, 69</sup>. A resistência das junções é alterada por várias substâncias, como a adenosina monofosfato cíclica e o cálcio que proporcionam seu aumento e a proteína C quinase, que diminuindo sua resistência, facilita a permeação de macromoléculas à mucosa intestinal<sup>70, 71, 72</sup>. A resistência também varia conforme a localização das células. As junções firmes localizadas entre as células das criptas são mais permeáveis que as junções das células das vilosidades.

### **3.1.2.2 - Via transcelular**

Os monossacarídeos, tais como a ranose e os PEGs de pesos moleculares menores, são capazes de alcançar a mucosa intestinal através dos poros presentes nas membranas dos enterócitos. A natureza destes poros é desconhecida, contudo, acredita-se que são compostos por canais aquosos, possivelmente ocupados também por proteínas<sup>73</sup>.

Em 1990, Maxton *et al*, após utilizarem soluções isosmolares e hiperosmolares contendo PEG 400, lactulose, ranose e  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ , observaram que havia correlação entre a permeação de lactulose e  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ . No entanto, tal fato não ocorreu entre o PEG 400, a ranose, a lactulose e o  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ , e assim propuseram pela existência de três rotas ou vias distintas para permeação dessas substâncias: paracelular (lactulose e  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ ), transcelular aquosa (ranose) e transcelular lipídica (PEG 400)<sup>74</sup>.

Em estudos posteriores, também não foi possível demonstrar a passagem do PEG 400 pela via transcelular aquosa<sup>75, 76, 77</sup>. Assim sendo, supõe-se que o PEG 400, apesar de ser hidrossolúvel, apresenta alguma afinidade por lípidos, explicando suas altas taxas de permeação.

Por outro lado, o tamanho e a forma das moléculas também podem influenciar nas taxas de permeação. Nos seres humanos, foi demonstrado que a massa molecular dos açúcares relaciona-se com as taxas de permeação<sup>74</sup>. O PEG 400, em vista de possuir forma geométrica linear e menor peso molecular, apresenta uma taxa maior de permeação. Mas *et al* correlacionaram ainda o diâmetro seccional dos poros com as taxas de permeação<sup>77</sup>.

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 resolvidos. 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>78</sup>. Nessa teoria, as junções firmes são responsáveis pela permeação de todas as substâncias e é sustentada pela presença de uma resistência

elétrica transepitelial. Essa resistência elétrica associa-se ao número de fios que formam o cinturão intercelular e varia de 25 a 1500ohm/cm<sup>2</sup>. A evidência de que a taxa de permeação do manitol relaciona-se de maneira inversa à resistência elétrica transepitelial explica sua porcentagem alta de permeação pela via paracelular. Outros autores forneceram ainda outros dados que completam esta teoria e justificam níveis diferentes de permeação entre as macro e micromoléculas<sup>79</sup>. Devido à heterogeneidade morfológica existente entre as junções intercelulares no intestino delgado, onde o poder de selamento das mesmas é maior à medida que os enterócitos migram das criptas para as vilosidades, pode-se afirmar que a permeação da lactulose e do <sup>51</sup>Cr-EDTA ficam restritas às junções firmes das criptas, enquanto que os monossacarídeos e o PEG 400, baseado no seu diâmetro seccional menor, apresentam permeação livre através do eixo cripta-vilosidade. Hollander ainda sugere que nas afecções intestinais a permeação de diferentes moléculas seria o resultado da interação entre as junções firmes de um lado, e da acessibilidade às criptas, de outro<sup>78</sup>.

Através dessas considerações descritivas, torna-se evidente que não existe um consenso para explicar as vias de permeação. Entretanto, é fato 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 monossacárides e do PEG 400 retrata a área absorptiva da mucosa, isto é, a estrutura vilositária que compõe o epitélio intestinal.

### **3.1.3 - Métodos para avaliação da permeabilidade intestinal**

Na atualidade, os testes utilizados para avaliação da permeabilidade intestinal podem ser divididos em três grupos: 1) aqueles que empregam açúcares, 2) isótopos e 3)

PEGs como marcadores. A escolha do teste adequado depende do conhecimento das propriedades de tais marcadores.

O marcador ideal deve ser biologicamente inerte e capaz de atravessar o epitélio intestinal por difusão não mediada, através de uma via conhecida. Para a realização de suas dosagens, quando comparado às amostras sanguíneas, a medida na urina é mais apropriada, pois a concentração dos marcadores no plasma é 100 vezes menor, o que torna a análise mais problemática. Por isso, a taxa de permeação pelo intestino é medida através da excreção renal após sua ingestão oral e o marcador deve ser filtrado e recuperado na urina, sem haver reabsorção tubular. Variações individuais como o esvaziamento gástrico, o trânsito intestinal, o “clearance” renal diminuído ou mesmo a coleta de urina de modo incompleto podem afetar o resultado do exame. Na ausência de um marcador ideal, a combinação de dois açúcares, uma macromolécula e uma micromolécula, minimiza tais variações, que podem afetar igualmente ambas as substâncias, permitindo com que não ocorra alteração no cálculo da relação entre a taxa de excreção dos mesmos e proporcionando diferenciação clínico-fisiopatológica entre eles. Na Tabela 1, encontra-se a relação dos marcadores mais utilizados, seu peso molecular e a porcentagem de excreção na urina utilizando-se soluções isosmolares e hiperosmolares.

Os testes com açúcares têm sido os mais utilizados e a combinação da lactulose com o manitol e a combinação da celobiose com manitol têm sido mais documentadas. A primeira tem alguma vantagem, pois as dissacaridases intestinais humanas têm efeito, ainda que pequeno, sobre a celobiose. Como citado anteriormente, existe uma confusão acerca da via de permeação do manitol; contudo, é presumível a participação, tanto da via paracelular quanto da transcelular<sup>80</sup>. Independente da via, sua permeação diminui na presença da atrofia vilositária<sup>81, 82</sup>. Já a lactulose tem sua permeação aumentada na

presença de qualquer processo inflamatório, secundário ao afrouxamento das junções firmes.

Tabela 1. Marcadores intestinais, seus pesos moleculares e as taxas de permeação intestinal em indivíduos sadios após ingestão oral em amostras de urina de 5 horas.

Marcador	Peso molecular Dáltons	Permeação	
		% excreção da dose oral/ 5horas	
		Isosmolar 200-300mosmol/kg	Hiperosmolar 1350-1500mosmol/kg
L-Arabinose	150	17,5*	-
L-ranose	164	10,1*	11,7*
D-manitol	182	16,8 * (22,4**)	20,6*
Lactulose	342	0,25* (2,7**)	0,41*
Celobiose	342	-	0,38*
<sup>51</sup> Cr-EDTA	359	0,64*	0,70*
Rafinose	504	0,26*	-
PEG 400	194-502	18,2*	20,3*
<sup>99m</sup> TcDTPA	549	2,8*	-
Dextran	3000	0,04*	0,12*

\* Travis S, Menzies I<sup>52</sup>

\*\* Vilela EG *et al*<sup>86</sup> ( resultados obtidos através da coleta de urina de 6 horas)

As soluções utilizadas devem, idealmente, ser isosmolares, pois permitem o estudo da barreira mucosa sem causar alterações sobre as mesmas, tal como acontece com soluções mais concentradas que determinam estresse hiperosmolar sobre a barreira mucosa e aumentam a permeação dos marcadores. No entanto, para triagem diagnóstica de doenças intestinais, as soluções hiperosmolares podem ser mais úteis, já que aumentam a sensibilidade do teste<sup>82</sup>. Outro monossacarídeo que pode ser utilizado é a

ranose que apresenta um comportamento semelhante ao do manitol (permeação diminuída na atrofia vilositária)<sup>83</sup>. Existe também a possibilidade de se utilizar a combinação de vários açúcares, como a lactulose/manitol com lactose, sacarose e palatinose em uma solução isomolar, pois permite avaliar a atividade da lactase, sacarase e isomaltase, além de propiciar o estudo da barreira intestinal<sup>74</sup>. A excreção destes açúcares pode ser medida através da cromatografia líquida de alta performance, cromatografia líquido-gasosa ou mesmo por ensaios enzimáticos<sup>84, 85, 86</sup>.

Os testes que utilizam isótopos são mais facilmente mensurados, mas apresentam como desvantagens o fato de serem testes que utilizam materiais radioativos como marcadores. O mais utilizado é o <sup>51</sup>Cr-EDTA que, por ser resistente a degradação bacteriana, torna-se útil também para a avaliação da permeabilidade colônica. Contudo, seus valores de excreção renal apresentam ampla variação nos controles e possui uma meia-vida relativamente curta (27 dias), não permitindo maior viabilidade das amostras para a análise<sup>51</sup>. O <sup>99</sup>Tc-Diethylenetriaminopenta-acetato (<sup>99</sup>Tc-DTPA) é um substituto do <sup>51</sup>Cr-EDTA, porém, apresenta meia-vida ainda menor (6 horas). Já foi utilizado com sucesso para avaliação da permeabilidade colônica em pacientes com retocolite ulcerativa<sup>87</sup>.

Por fim, pode-se estudar a permeabilidade intestinal através da utilização de moléculas de polietilenoglicol (PEG-400, PEG-600, PEG-1000 e PEG-4000). O PEG-400 é mais acessível, pois encontra-se comercialmente disponível e é composto por polímeros de peso molecular que variam de 194 a 502, que podem ser separados por cromatografia líquida de alta performance<sup>88</sup>. Essa suposta vantagem de se avaliar concomitantemente moléculas de tamanhos diferentes não foi constatada na prática, pois houve ampla variação de seus níveis em indivíduos normais. Outro revés foi evidenciado quando do estudo da permeabilidade intestinal em celíacos. A taxa de

permeação entre as moléculas maiores pelas moléculas menores estava diminuída, ao contrário do que se imaginava, como acontece com a relação entre a lactulose/manitol e celobiose/manitol<sup>88, 89</sup>.

### **3.1.4 - Aplicações clínicas**

O interesse clínico pelas medidas da permeabilidade intestinal baseia-se no fato de ser um exame não invasivo e permitir a avaliação funcional da barreira mucosa intestinal, o que o torna sob esse aspecto mais vantajoso quando comparado com o método diagnóstico reconhecido como padrão-ouro para avaliação morfológica de lesões da mucosa intestinal, a biópsia jejunal peroral<sup>90</sup>. Entretanto, ainda que represente uma medida útil e reconhecida do grau de lesão da barreira exercida pela mucosa intestinal, seu potencial como teste diagnóstico para doenças do trato digestivo necessita ser determinado.

A medida da permeabilidade tem sido recomendada como "ferramenta diagnóstica" para que sejam descartadas lesões da mucosa intestinal e, principalmente, como parâmetro de grande utilidade na monitorização terapêutica dos pacientes<sup>51</sup>. Sua capacidade de indicar a presença de anormalidade histológica da mucosa tem sido amplamente discutida. Aqueles que defendem essa aplicação acreditam que os testes de permeabilidade intestinal possam ser utilizados em situações especiais, como em pacientes com sintomatologia pouco característica do trato digestivo, em crianças e em jovens que exibem distúrbios do crescimento, nos quais a doença celíaca e a doença de Crohn permanecem como suspeita diagnóstica e, finalmente ainda, como forma de confirmar a indicação da biópsia intestinal peroral, ou outra avaliação funcional<sup>90</sup>. Por outro lado, cumpre lembrar que um exame normal não afasta a possibilidade de lesões

da mucosa de grau leve, não eliminando, portanto, a necessidade de outras avaliações diagnósticas.

Assim sendo, observa-se que, se por um lado a medida da permeabilidade intestinal é tratada como um teste diagnóstico, por outro lado é apontada como um método adjuvante, que não elimina a possibilidade de lesão da mucosa. É possível que essa ambigüidade se deva ao não conhecimento das reais potencialidades do teste, medida pelos parâmetros mais comuns de avaliação de eficácia de um teste diagnóstico, ou seja, sensibilidade, especificidade, valores de predição positiva e negativa e razão de verossimilhança. Acreditamos que esses parâmetros deveriam ser avaliados para as diversas doenças com seus respectivos espectros clínicos. A literatura consultada não dispõe de informações científicas mais detalhadas a esse respeito.

A quebra da integridade da barreira mucosa tem sido associada a mecanismos etiopatogênicos comuns a várias doenças de caráter inflamatório do trato digestivo, bem como às doenças extra-intestinais de caráter auto-imune, como o diabetes *mellitus* e a dermatite atópica<sup>91, 92</sup>. Na doença celíaca, a permeabilidade intestinal encontra-se caracteristicamente alterada nos pacientes não tratados, com uma sensibilidade de até 96%, usando-se a técnica de dois açúcares, atingindo a 100% em alguns estudos em que foi usado o <sup>51</sup>Cr-EDTA<sup>93, 94</sup>. A redução da absorção das moléculas de menor tamanho, como a ranose e o manitol, parece ser consequência da atrofia da mucosa intestinal, com a perda de área absorptiva. Por outro lado, o aumento da passagem das moléculas de maior tamanho, como a lactulose e o <sup>51</sup>Cr-EDTA, podem indicar maior exposição das vias paracelulares das criptas e até mesmo alterações de funcionamento das junções firmes relacionadas ao processo inflamatório. Com relação à alergia alimentar, supõe-se que qualquer alteração na maturação da barreira intestinal pode ocasionar aumento da exposição de antígenos ingeridos por via oral e, assim, determinar resposta inflamatória.



A presença de anticorpos circulantes contra antígenos alimentares durante os três primeiros meses de vida sustenta tal hipótese<sup>95</sup>.

A lesão da barreira mucosa relaciona-se também à manutenção da resposta inflamatória em doentes críticos, mesmo após a erradicação de infecções e focos de inflamação, conduzindo à Síndrome da Falência de Múltiplos Órgãos e, eventualmente, ao óbito<sup>96</sup>. Acredita-se, no entanto, que o excesso de antígenos e bactérias que atingem o organismo através da luz intestinal associa-se a fenômenos de ordem imunológica, não apenas no trato digestivo.

### **3.1.5 Doença de Crohn e permeabilidade intestinal**

Embora a etiologia da doença de Crohn seja desconhecida, postula-se a existência de uma resposta imunológica alterada ou exagerada por parte do sistema imune da mucosa intestinal a antígenos luminiais<sup>24</sup>. Em face desta hipótese ser verdadeira, poder-se-ia supor o desenvolvimento da doença em três etapas. A primeira, a predisposição genética para reagir a um antígeno luminal de forma acentuada, ou uma redução dos mecanismos de tolerância imunológica, normalmente desenvolvidos pelo sistema imunológico da mucosa. A segunda, a presença do antígeno que provoca a resposta imune ou do estímulo inflamatório. A terceira, o envio ou a apresentação do agente ao sistema imunológico da mucosa de uma maneira que resulte em inflamação, quando normalmente resultaria em tolerância. Tal evento pode ser o resultado da passagem pela via paracelular deste agente, que pode determinar reação inflamatória mais intensa. Assim, a permeabilidade intestinal aumentada é vista como um mecanismo que permite a apresentação de antígenos luminiais ou compostos pró-inflamatórios ao sistema imune da mucosa intestinal que pode determinar o início da inflamação<sup>97</sup>. Através da medida da taxa de excreção de macromoléculas como a

lactulose, podemos dimensionar ou mesmo retratar a quebra de barreira intestinal pela via paracelular.

Em relação ao curso clínico da DC, caracterizado por períodos de atividade e remissão, essa terceira etapa parece ser a única passível de variação fisiológica, já que a predisposição genética não varia e a dieta tende a ser mais ou menos constante. Tal raciocínio enseja a discussão da relação entre as variações da permeabilidade, o desenvolvimento e o curso clínico da DC. Na hipótese de confirmação da existência dessa relação, as seguintes afirmações necessitam ser confirmadas: 1) os indivíduos passíveis de desenvolver a DC apresentam aumento da permeabilidade intestinal; 2) o aumento da permeabilidade diminuirá durante o período das remissões; 3) os eventos que precipitam ou antecedem a atividade da doença deverão aumentar a permeabilidade intestinal<sup>97</sup>.

A primeira questão tem sido abordada no estudo de parentes e esposas de portadores de DC. Apesar de existir importantes divergências quanto aos resultados desses estudos, concorda-se hoje que, cerca de 10% dos parentes de portadores de DC apresentam aumento da permeabilidade intestinal<sup>98, 99, 100, 101</sup>. Por outro lado, ao se estudar as esposas dos portadores da doença, foram observadas alterações da permeabilidade em 13,3% delas, fato que chama a atenção, apesar do pequeno tamanho da amostra<sup>102</sup>. Dessa forma, uma alteração da permeabilidade de origem genética ou ambiental (alimentar) pode preceder o desenvolvimento da doença, na condição de fator predisponente ou desencadeante<sup>100</sup>.

Essas hipóteses têm sido fortalecidas pelo achado, nestes indivíduos, de uma fração de células circulantes que expressam o fenótipo CD45RO. A presença desse marcador sugere tratar-se de células de memória imunológica, cuja presença pode estar relacionada a um aumento do aporte de antígenos nesse grupo de pacientes,

provavelmente devido a um aumento de sua passagem do lúmen intestinal para a lâmina própria e, a seguir, para a corrente sanguínea<sup>103</sup>.

Embora as flutuações na permeabilidade possam ocorrer espontaneamente, postula-se que os indivíduos com risco de desenvolver a DC também possam ser excessivamente sensíveis a agentes que provocam o aumento da permeabilidade intestinal. Essa hipótese foi testada com o uso de anti-inflamatórios não esteróides, quando se detectou uma resposta exagerada da permeabilidade intestinal em um subgrupo de parentes de portadores da DC<sup>104</sup>.

Quanto à tendência de redução das medidas de permeabilidade intestinal durante as remissões, essas evidências têm sido observadas e demonstradas em diversos estudos, tornando a utilização do teste de permeabilidade importante para acompanhar a atividade da doença e monitorizar a resposta ao tratamento<sup>101,105,106</sup>.

Se os eventos que precipitam ou antecedem a atividade da doença aumentam a permeabilidade intestinal, esse aspecto é ainda pouco estudado. Contudo, já se demonstrou uma diferença significativa entre a incidência de recaídas em grupos de seguimento pós-operatório com baixa e alta permeabilidade intestinal: cerca de 70% em pacientes com permeabilidade elevada, contra 17% em pacientes com permeabilidade normal<sup>107</sup>.

Em suma, em um subgrupo de pacientes com risco de desenvolvimento ou de recaída da DC, estes apresentam aumento de permeabilidade, sugerindo fortemente seu papel como fator predisponente ou desencadeante. O que necessita maiores esclarecimentos é se isto representa um defeito estrutural das junções firmes ou se trata de um defeito de regulação do próprio enterócito. Outra questão importante envolve a ordem dos acontecimentos no processo etiopatogênico da doença, ou seja, se a perda da integridade da mucosa intestinal constitui o evento primário ou secundário a fenômenos

imunológicos que acarretariam a resposta inflamatória com conseqüente aumento da permeabilidade intestinal. Apesar de não haver ainda uma resposta precisa, acredita-se que o elo entre os fenômenos possa ser desempenhado pelo TNF-  $\alpha$ <sup>35, 108, 109</sup>. Sabe-se ainda que a utilização do anticorpo quimérico anti-TNF- $\alpha$  reduz a permeabilidade intestinal nos pacientes com DC<sup>110</sup>.

Portanto, o teste de permeabilidade intestinal tornou-se um exame útil no monitoramento da resposta terapêutica e na avaliação dos processos etiopatogênicos associados a várias afecções intestinais. Também pode ser útil como exame de triagem diagnóstica inicial. É provável ainda que sua aplicação se estenda à avaliação da atividade inflamatória da DC. Contudo, trata-se de um exame não disponível em “kits” comerciais e cada centro que domina a técnica o faz de modo diferente e em laboratórios de pesquisa. Os serviços que realizam este procedimento são poucos e, certamente, há muito que se estudar, não apenas na DC, mas também em outras afecções digestivas como na síndrome do intestino irritável, no supercrescimento bacteriano e em doenças extra-intestinais, cuja etiopatogenia envolve a permeação de antígenos através da mucosa intestinal.

## **4 – CASUÍSTICA E MÉTODOS**

## 4 – CASUÍSTICA E MÉTODOS

### 4.1 - Casuística

Foram incluídos no estudo 34 pacientes com diagnóstico de DC em fase de remissão, acompanhados de modo prospectivo por um período de três meses no Ambulatório de Intestino do Instituto Alfa de Gastroenterologia (IAG), do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HCUFMG). O diagnóstico da DC foi baseado em manifestações clínicas associadas a achados laboratoriais, radiológicos, endoscópicos e histológicos. A definição de remissão da doença foi obtida através da determinação do Índice de Atividade da Doença de Crohn (CAI), que deve ser inferior a 150<sup>111</sup>. A Tabela 2 relaciona os elementos que compõe este indicador.

Tabela 2. Índice de Atividade da Doença de Crohn (CAI).

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

Os pacientes incluídos no estudo estavam em remissão há mais seis meses, segundo os critérios do CDAI e, no período de acompanhamento, os medicamentos utilizados pelos pacientes foram mantidos da mesma forma que estavam usando.

Constituíram-se critérios de exclusão à pesquisa, pacientes com idade inferior a 18 anos, idosos, mulheres grávidas ou em fase de amamentação, pacientes com doenças agudas ou crônicas concomitantes, bem como aqueles com doença renal avançada.

Uma vez definida a condição de remissão da doença (CDAI < 150 pontos), os pacientes foram randomizados em dois grupos conforme a classificação de Viena (Tabela 3)<sup>112</sup>.

Tabela 3. Classificação de Viena da Doença de Crohn.

Idade ao diagnóstico (A)	A1: < 40 anos A2: > 40 anos
Localização (L)	L1: íleo terminal L2: cólon L3: ileocolon L4: trato gastrointestinal superior
Comportamento (B)	B1: não estenosante, não penetrante B2: estenosante B3: penetrante

O primeiro grupo, composto de 17 pacientes recebeu uma substância inerte, o placebo, apresentado em cápsulas para uso oral. O segundo grupo, também com 17 pacientes, recebeu o medicamento contendo o *Sacharomyces boulardii*, apresentado em cápsulas para uso oral com o nome de Floratil<sup>®</sup>. Um terceiro grupo adicional, constituído por 11 indivíduos voluntários, sadios e saudáveis, foi utilizado também como grupo controle, dentro dos preceitos éticos de investigação em seres humanos.

Todos os 17 pacientes do primeiro e do segundo grupo foram clinicamente examinados pelo pesquisador principal a nível ambulatorial. Um segundo pesquisador avaliou os pacientes imediatamente antes e os acompanhou durante o período de três

meses, anotando em protocolo de pesquisa as eventuais manifestações clínicas ocorridas durante o ensaio terapêutico, bem como alterações ao exame físico.

Durante a fase inicial do estudo, três pacientes não seguiram o protocolo em face de manifestações de intolerância e abandono do tratamento, sendo dois do grupo Placebo e outro que recebeu o *S. boulardii*, identificados pelo código do segundo pesquisador.

O segundo pesquisador é que administrava o medicamento nessa fase do estudo e acompanhava os pacientes, de sorte que o ensaio se constituía em duplo-cego para o pesquisador principal e para os pacientes. Ao final da pesquisa, é que os códigos foram revelados e, assim os pacientes de cada grupo identificados.

#### **4.1.1 – Substâncias submetidas ao ensaio**

O *S. boulardii* foi preparado e fornecido pela Merck S. A. Indústrias Químicas, em cápsulas de 200mg de liofilizado, contendo cerca de  $4 \times 10^8$  células de *S. boulardii*-17, 71,6mg de sacarose e 2,4mg de estearato de magnésio.

O placebo também foi preparado pela Merck S. A.. Cada cápsula apresentava 200mg de celulose, 6mg de sacarose e 2,4mg de estearato de magnésio. Esta quantidade de celulose foi acrescida ao Placebo para equiparar o peso desta preparação com o do princípio ativo. Cumpre esclarecer que a celulose nessa dosagem é inerte para o organismo humano. As dosagens de sacarose e de estearato de magnésio utilizadas também na preparação das cápsulas são consideradas inertes, o que não interferiu com o resultado do estudo.

As cápsulas do Placebo e do medicamento *S. boulardii* eram de aparência idêntica e com o número do código no frasco que as identificava (1º grupo, número 1; 2º grupo, número 2, respectivamente).



Os pacientes de ambos os grupos, primeiro e segundo, recebiam a substância em ensaio, na dose de uma cápsula de 8/8h, totalizando três ao dia, por via oral, diariamente, durante três meses seguidos, ininterruptos. Os pacientes recebiam a medicação para uso durante um mês para o primeiro controle e dois meses para o segundo controle, ocasiões em que eram avaliados.

## **4.2 – Métodos**

### **4.2.1 – Teste de permeabilidade intestinal**

Com o objetivo de avaliar a influência do *S. boulardii* no tratamento da DC, o teste de permeabilidade intestinal foi realizado imediatamente antes do início do tratamento (T0), após um mês (T1) e após 3 meses (T3) do início da terapêutica probiótica. Ao mesmo tempo, os pacientes eram submetidos à avaliação clínica e realizavam os exames de laboratório, entre eles o hemograma completo para preenchimento do CDAI. Essas avaliações eram realizadas pelo segundo pesquisador, sendo completadas as tabelas de pontos do CDAI.

Para realização do teste de permeabilidade intestinal foram utilizadas duas substâncias, uma macromolécula (lactulose) e um micromolécula (manitol) e a taxa de excreção destes produtos foi quantificada na urina.

Após dez horas de jejum, o paciente comparecia ao HCUFMG pela manhã e, em seguida, era orientado para eliminar qualquer eventual resíduo urinário. Uma medida padrão contendo 6,0g de lactulose e 3,0g de manitol, diluídas em uma quantidade suficiente de água para completar 120mL de solução, era então ingerida pelo paciente. A osmolaridade dessa solução é semelhante à plasmática, com a finalidade de se evitar qualquer dano ao epitélio estudado. Durante seis horas, todo o produto do ato miccional era coletado em um frasco vedado com a finalidade de se evitar a perda e a evaporação

das substâncias contidas na urina. Ao final desse período, uma alíquota de 50mL era armazenada em um segundo frasco menor e a ela se adicionava 12mg de timerosal, para impedir o crescimento bacteriano. As amostras eram estocadas em um botijão de nitrogênio líquido, com temperatura de  $-180^{\circ}\text{C}$ , permitindo, assim, a utilização dessas amostras em ocasiões futuras.

Para a dosagem das substâncias administradas foi utilizado o aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC), da marca Shimadzu®, composto por uma bomba injetora, um auto-injetor, um controlador integrado a um “softwear” que permitia que as leituras fossem interpretadas sob uma plataforma do tipo “workstation”, e um medidor de índice de refração, presentes no Laboratório de Pesquisas do IAG. O material de consumo para a realização da taxa de excreção urinária era o seguinte:

vidraria

água milliQ

filtro micropore

resina de troca iônica

ácido fosfórico 0,1%

pré-coluna Supelcogel 33H®

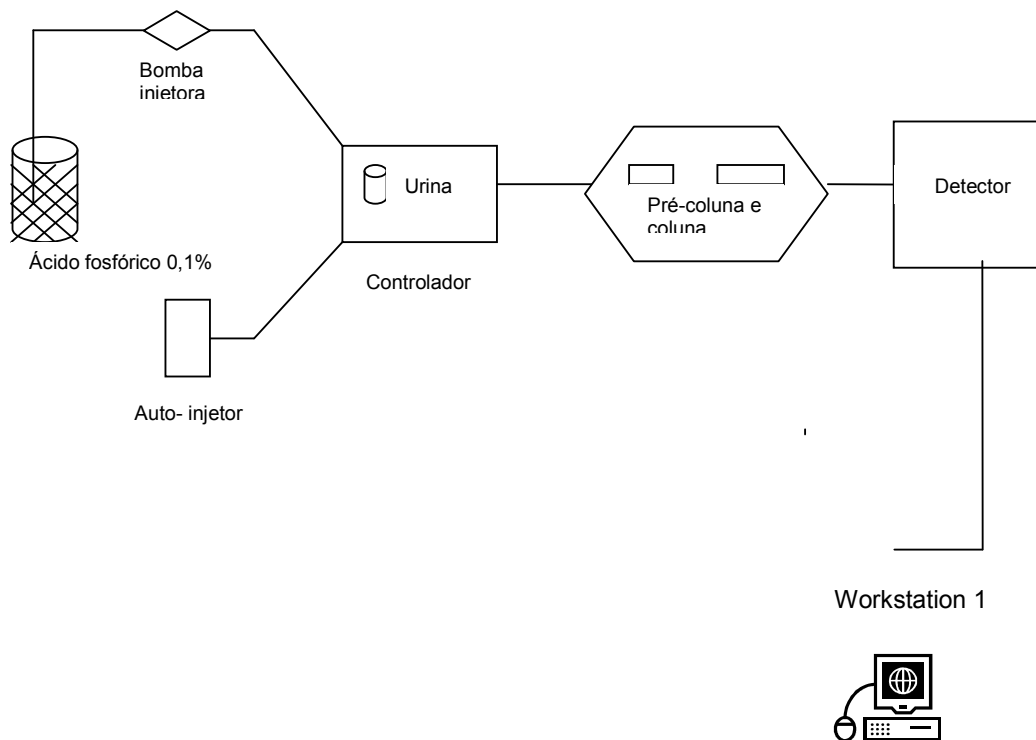
coluna Supelcogel C-610H®

Do ponto de vista técnico, pequena quantidade de urina, depois de filtrada em “micropore” e passada por uma resina de troca iônica, era introduzida no aparelho através de um auto-injetor. Simultaneamente, de maneira contínua, uma solução de ácido fosfórico a 0,1% era utilizada na fase móvel a um fluxo pré-determinado de 0,5mL/min e servia como elemento padrão a partir do qual, por princípios físicos de refração, diferenciava a lactulose do manitol após a separação exercida pela pré-coluna Supelcogel 33H® e pela coluna Supelcogel C-610H®. No módulo que operava por

índice de refração, amplitudes diferentes de ondas geradas pela solução contendo a lactulose e o manitol eram captadas e interpretadas pela “workstation”, em tempos diferentes, proporcionados pela separação ocorrida na pré-coluna e coluna, chamados de tempo de retenção. Na “workstation”, tais leituras de amplitude de onda eram condicionadas em elementos gráficos. Na Figura 2, observa-se a fotografia do aparelho e a seguir, na Figura 3 está representado um diagrama esquemático para melhor entendimento da técnica.



Figura 2. Fotografia produzida pelo próprio autor do aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Performance no Laboratório de Pesquisa do IAG.



**Figura 3.** Diagrama que ilustra de modo esquemático as etapas necessárias para a mensuração da lactulose e do manitol no HPLC. Enquanto ocorre a fase móvel proporcionada pela passagem da solução de ácido fosfórico a 0,1% pelo aparelho, o controlador aciona o auto-injetor, para que as substâncias que serão medidas tenham o mesmo fluxo que o ácido fosfórico através da pré-coluna e coluna e, em seguida, percorra até detector que opera por índice de refração. As leituras do detector são interpretadas pela “workstation” através de elementos gráficos que analisarão as áreas sobre as curvas.

Para a padronização do teste e o adequado conhecimento dos valores medidos na unidade g/L, quantidades conhecidas da lactulose e do manitol foram avaliadas em separado e repetitivamente no HPLC, com a finalidade de se compor a equação da reta dos mesmos ( $y = ax + b$ ) e, assim, permitir a obtenção dos números e suas respectivas grandezas. A área sobre a curva obtida de cada molécula através de uma “workstation” corresponde à concentração das duas substâncias em g/L na urina. Na figura 4 encontra-se ilustrada a equação da reta da lactulose e na figura 5 a equação da reta do manitol.



Figura 4. Ilustração do gráfico que representa a equação da reta da lactulose. A partir de concentrações conhecidas de lactulose, obtinha-se os valores numéricos das áreas sobre as curvas, o que proporcionou a elaboração da equação  $y = ax + b$ , onde  $y$  representa a área sobre a curva e  $x$  representa a concentração da lactulose.

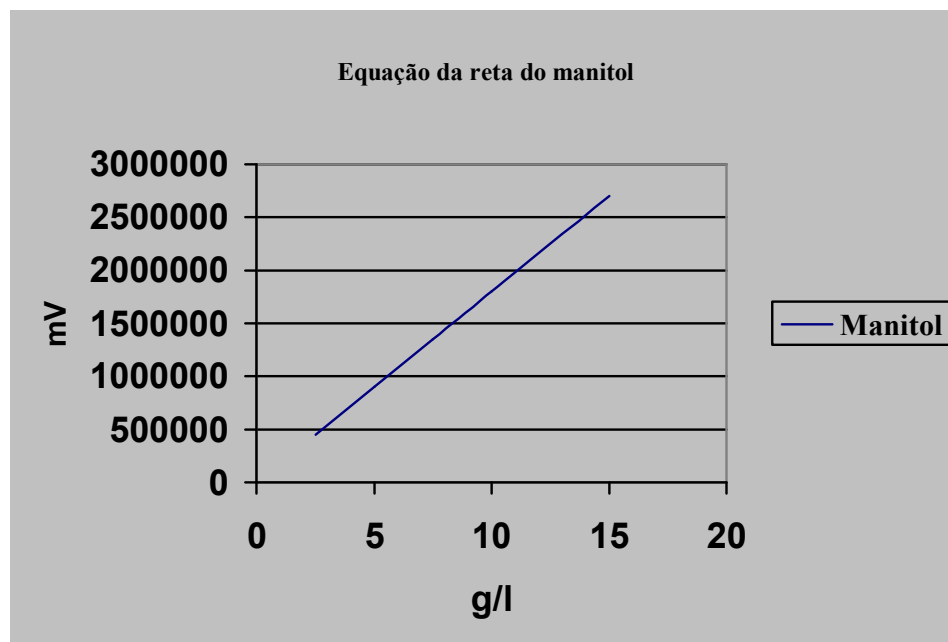


Figura 5. Ilustração do gráfico que representa a equação da reta do manitol. A partir de concentrações conhecidas de manitol, obtinha-se os valores numéricos das áreas sobre as curvas, o que proporcionou a elaboração da equação  $y = ax + b$ , onde  $y$  representa a área sobre a curva e  $x$  representa a concentração do manitol.

Após a obtenção das duas equações da reta, o material a ser analisado era introduzido no aparelho e interpretado pela “workstation”, assim obtivemos números que representavam as áreas sobre as curvas. Esses números indicavam os valores de y em mV e, uma vez aplicada a equação da reta, determinava-se então os valores de x. Tais valores representavam as concentrações em g/L das duas substâncias. Em seguida calculava-se as taxas de excreção da lactulose e do manitol através das seguinte fórmulas:

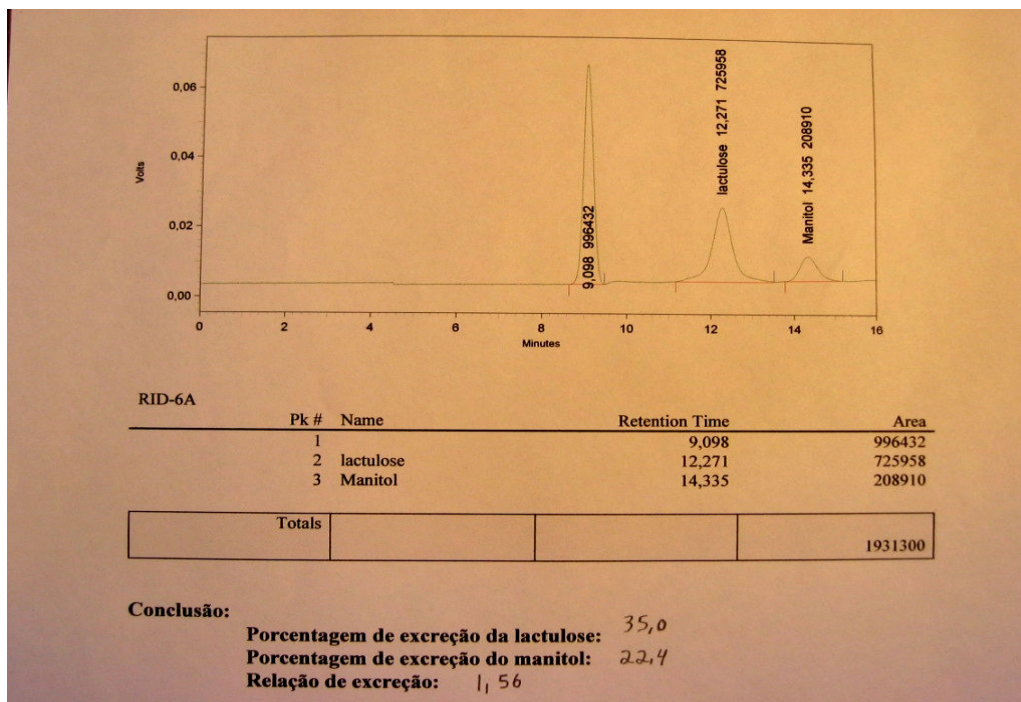
$$\frac{x \times \text{vol}_{(u)}/1000}{6} \times 100$$

para a lactulose, sendo  $\text{vol}_{(u)}$  o volume urinário obtido em seis horas e o denominador 6, representando a quantidade total de lactulose oferecida

$$\frac{x \times \text{vol}_{(u)}/1000}{3} \times 100$$

para o manitol, sendo  $\text{vol}_{(u)}$  é o volume urinário obtido em seis horas e o denominador 3, representando a quantidade total de manitol oferecida

Para a relação entre os mesmos, dividia-se a taxa de excreção da lactulose pela taxa de excreção do manitol. Abaixo, na Figura 5 segue-se um exemplo de um teste de permeabilidade intestinal e os procedimentos necessários para a obtenção dos resultados.



**Figura 6.** No gráfico está representada a área sobre a curva da lactulose no valor de 725958, situada no tempo de retenção 12,271 minutos. Este valor numérico da lactulose representa o valor de y na equação da reta e, por conseguinte, temos o valor de x que é igual a 3,75 em g/L. Obtido este valor de x, aplica-se a fórmula:

$$\frac{3,75 \times 560/1000}{6} \times 100 = 35\% \text{ (taxa de excreção da lactulose)}$$

Para o manitol, o procedimento é o mesmo. A área sobre a curva é de 208910 que apareceu no tempo de retenção de 14,335 minutos. Este valor representa o y para o manitol e, como temos a equação da reta, concluímos que o valor de x é igual a 1,2g/L. Na fórmula:

$$\frac{1,2 \times 560/1000}{3} \times 100 = 22,4\% \text{ (taxa de excreção do manitol)}$$

Por fim a relação de excreção: 1,56

#### 4.2.2 – Estatística

Todos os dados coletados foram armazenados no EPI INFO versão 6.0. Para a análise da divisão da frequência foi empregado o teste qui-quadrado e quando necessário, o teste exato de Fisher (valor esperado em uma casela menor que 5). Para a comparação de médias em amostras independentes foi empregado a análise de variância e quando os dados não apresentaram distribuição gaussiana foi realizado a comparação

de medianas pelo teste de Kruskal-Wallis. Dentro de um grupo antes/depois foi empregado o teste t de Student pareado. Para estudo de associação entre duas variáveis foi empregado a correlação e a regressão linear simples. Foi considerado o valor de 5% ( $p < 0,05$ ) como limiar de significância estatística.

#### **4.2.3 – Ética**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, parecer número ETIC 129/05. Todos os pacientes e voluntários assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido antes do início do estudo.



## **5 - RESULTADOS**

## 5 – RESULTADOS

Foram incluídos 34 pacientes com diagnóstico de DC em fase de remissão. Durante a primeira semana de tratamento, três pacientes interromperam o uso da medicação sem a consulta prévia dos pesquisadores. Dois pacientes pertenciam ao grupo Placebo e alegaram dor abdominal de forte intensidade, náuseas, vômitos e diarreia com duração de poucas horas e associaram tais queixas à introdução da nova medicação. Apesar dos sintomas relatados não procuraram assistência médica. Quando compareceram em T1, os pacientes encontravam-se assintomáticos. O terceiro paciente, que pertencia ao grupo *S. boulardii*, abandonou o uso da medicação, optando por sua exclusão do protocolo de estudo.

Dos 31 pacientes que completaram o tratamento, 18 pacientes eram do sexo masculino (58,1%) e treze do sexo feminino (41,9%). A idade variava entre 19 e 54 anos, com média de 37 anos. O CDAI antes do início do tratamento apresentava média de 57,4 pontos e desvio-padrão de 41,1, com mediana de 56,0 pontos. Quando analisado separadamente, nos grupos Placebo e grupo *S. boulardii*, a média foi 62,8, com desvio-padrão de 44,6 e mediana de 56,0 para o grupo Placebo e média de 50,7, com desvio-padrão de 36,9 e mediana de 52,0 para o grupo *S. boulardii*. O valor de p foi de 0,66, o que demonstra a semelhança entre os dois grupos em relação à pontuação inicial do CDAI.

A idade era inferior a 40 anos (A1) em 25 pacientes (80,6%) e, em seis pacientes (19,4%), a idade era igual ou maior a 40 anos (A2). O íleo terminal (L1) estava acometido pela doença em 20 pacientes (64,5%) e o íleo e o cólon (L3) estavam acometidos de modo simultâneo em 11 pacientes (35,5%). A DC, nesta casuística, apresentava o comportamento não estenosante, não penetrante (B1) em cinco pacientes

(16,1%), estenosante (B2) em 11 (35,5%) e penetrante (B3) em 15 (48,4%). O Placebo foi utilizado em 17 pacientes e o *S. boulardii* em 14 pacientes. A alocação dos medicamentos entre os grupos Placebo e *S. boulardii* foi aleatória e se baseou na classificação de Viena<sup>112</sup>. Realizada a análise estatística da randomização, observou-se que os grupos eram semelhantes entre si (Tabela 4).

**Tabela 4.** Resultados da randomização do tratamento entre o grupo Placebo e o grupo *S. boulardii* nos pacientes com DC, realizada com base na classificação de Viena.

Classificação de Viena (%)	Placebo N	<i>S. boulardii</i> N	Teste estatístico	P
Idade A1 (80,6)	13	12	Teste exato de Fisher	0,66
A2 (19,4)	4	2		
Localização L1 (65,4)	9	11	Qui-quadrado	0,96
L3 (35,5)	8	3		
Comportamento B1 (16,1)	3	2	Teste exato de Fisher	0,27
B2 (35,5)	6	5		
B3 (48,4)	8	7		

Os medicamentos utilizados pelos pacientes na fase de remissão da doença foram mantidos. A mesalazina, na dose de 3,0g/dia, foi utilizada por 11 pacientes (35,5%), a azatioprina na dose de 2,0mg/kg/dia foi utilizada por 10 pacientes (32,3%), a associação da mesalazina, azatioprina e prednisona nas doses de 3,0g/dia, 2,0mg/kg/dia e 10mg/dia, respectivamente, foi utilizada por quatro pacientes (12,9%), a associação de mesalazina e azatioprina, nas doses de 3,0g/dia e 2,0mg/kg/dia, respectivamente, por dois pacientes (6,5%), a talidomida, na dose de 100mg/dia, por um paciente (3,2%) e a associação talidomida e metronidazol, nas doses de 100mg/dia e 1500mg/dia, respectivamente, por um paciente (3,2%). Apesar da randomização não ter sido baseada nos medicamentos utilizados na fase de remissão da doença, os grupos também foram semelhantes entre si, como mostra a Tabela 5.

Tabela 5. Resultados da randomização do tratamento entre os grupos Placebo e *S. boulardii* com base nos medicamentos utilizados na fase de remissão da DC.

Tipo de tratamento (%)	Placebo N	<i>S. boulardii</i> N	Teste estatístico	P
Mesalazina (35,5)	4 13	6 8	Teste exato de Fisher	0,44
Azatioprina (32,3)	5 12	5 9	Teste exato de Fisher	1,00
Azatioprina/mesalazina/corticóide (12,9)	4 13	0 14	Teste exato de Fisher	0,11
Azatioprina/mesalazina (6,5)	2 15	0 14	Teste exato de Fisher	0,49
Talidomida (3,2)	0 17	1 13	Teste exato de Fisher	0,45
Talidomida/metronidazol (3,2)	1 16	0 14	Teste exato de Fisher	1,00

O teste de permeabilidade intestinal foi realizado para permitir que, de maneira objetiva, fosse avaliada a influência do uso do *S. boulardii* nos pacientes com DC em fase de remissão. O teste consistia na medida da porcentagem de excreção da lactulose e do manitol na urina e na relação entre a taxa de excreção da lactulose e do manitol e foi realizado em T0, T1 e T3. Observa-se também que, inicialmente, os valores do teste de permeabilidade intestinal eram semelhantes entre os dois grupos (Tabela 6).

Tabela 6. Comparação entre as medianas das porcentagens de excreção da lactulose, porcentagem de excreção do manitol e relação entre a taxa de excreção da lactulose e do manitol imediatamente antes do início do tratamento.

Teste de permeabilidade Intestinal	N	Média	Desvio-padrão	Mediana (Amplitude)	P
% excreção da lactulose					
Placebo	17	16,30	4,69	16,48 (9,60-19,10)	0,42
<i>S. boulardii</i>	14	19,88	10,04	19,00 (6,00-22,00)	
% excreção do manitol					
Placebo	17	21,14	3,94	21,60 (13,53-26,06)	0,91
<i>S. boulardii</i>	14	21,42	4,65	20,50 (15,40-29,45)	
relação entre a taxa de excreção da lactulose e do manitol					
Placebo	17	0,79	0,24	0,86 (0,40-1,18)	0,78
<i>S. boulardii</i>	14	0,95	0,48	0,79 (0,36-1,86)	

O teste de permeabilidade intestinal foi realizado também em 11 voluntários sadios. A média da porcentagem de excreção da lactulose foi de 2,75%, com desvio-padrão de 1,71 e mediana de 2,56%. A média da porcentagem de excreção do manitol foi de 22,56%, com desvio-padrão de 3,32 e mediana de 23%. A média da taxa de excreção entre a lactulose e o manitol foi de 0,133, com desvio-padrão de 0,153 e mediana de 0,100. Com a finalidade de se avaliar a integridade da mucosa intestinal nos pacientes com DC em fase de remissão foi feita a comparação entre estes valores e os valores obtidos do teste de permeabilidade intestinal nos pacientes com DC antes do início do tratamento. Observa-se que as medianas das porcentagens de excreção da lactulose e as medianas das taxas de excreção entre a lactulose e o manitol são diferentes. Com relação às medianas das porcentagens de excreção do manitol, os resultados não diferem entre si, como é visto na Tabela 7.

Tabela 7. Comparação do teste de permeabilidade intestinal entre voluntários saudáveis e pacientes com DC em fase de remissão antes do início do tratamento.

Teste de permeabilidade Intestinal	N	Média %	Desvio-padrão	Mediana % (Amplitude)	P
%L					
Voluntários sadios	11	2,75	1,71	2,56 (1,9 – 5,8)	
Pacientes com DC	31	17,92	7,65	16,80 (6,0 – 40,7)	0,002
%M					
Voluntários sadios	11	22,56	3,32	23,00 (8,3 – 26,1)	
Pacientes com DC	31	21,27	4,20	21,00 (15,9 – 29,5)	0,58
$T_{LM}$					
Voluntários sadios	11	0,13	0,15	0,10 (0,08 – 0,32)	
Pacientes com DC	31	0,85	0,37	0,86 (0,30 – 1,86)	0,016

Em seguida, foi realizada a comparação entre as médias das diferenças das porcentagens de excreção da lactulose, do manitol e relação entre a excreção de ambos entre T1 e T0, T3 e T0 e T3 e T1, com a finalidade de se avaliar a influência do *S. boulardii* na permeabilidade intestinal, como nos mostram as tabelas 9, 10 e 11. Nas Figuras 7, 8 e 9 estão representados, através de gráficos, os valores da taxa de excreção da lactulose, do manitol e da relação da excreção entre ambos, em T0, T1 e T3, como mostra a Tabela 8.

Tabela 8. Resultados das taxa de excreção da lactulose, do manitol e da relação entre ambos nos grupo Placebo e *S. boulardii*, em T0, T1 e T3.

	T0	T1	T3
%L Placebo	16,30%	19,00%	20,13%
<i>S. boulardii</i>	19,88%	17,77%	16,04%
%M Placebo	21,14%	21,61%	21,93%
<i>S. boulardii</i>	21,42%	20,33%	20,82%
$T_{LM}$ Placebo	0,79	0,903	0,935
<i>S. boulardii</i>	0,95	0,895	0,775

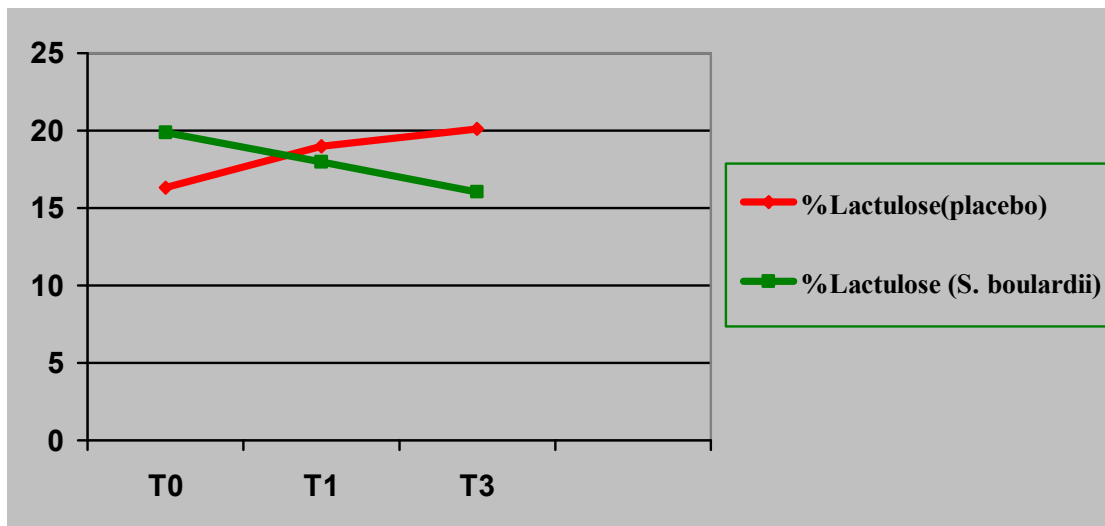
**Tabela 9.** Comparação entre as diferenças das médias das porcentagens de excreção da lactulose nos pacientes com DC submetidos ao tratamento com *S. boulardii* e o Placebo por um período de três meses.

	N	Média das diferenças	Desvio-padrão	P
$\Delta \%L1-L0$				
Placebo	17	+2,70	6,37	0,09
<i>S. boulardii</i>	14	-2,11	2,52	0,008
$\Delta \%L3-L0$				
Placebo	17	+3,83	10,79	0,16
<i>S. boulardii</i>	14	-3,84	5,25	0,017
$\Delta \% L3-L1$				
Placebo	17	+1,24	11,99	0,67
<i>S. boulardii</i>	14	-1,79	4,28	0,14

$\Delta \%L1-L0$ : diferença entre as médias das porcentagens de excreção da lactulose entre o final do primeiro mês e o início do tratamento.

$\Delta \%L3-L0$ : diferença entre as médias das porcentagens de excreção da lactulose entre o final do terceiro mês e o início do tratamento.

$\Delta \% L3-L1$ : diferença entre as médias das porcentagens de excreção da lactulose entre o final do terceiro mês e o final do primeiro mês de tratamento.



**Figura 7.** Representação gráfica do comportamento da porcentagem de excreção da lactulose em pacientes com DC no grupo Placebo e no grupo *S. boulardii* durante três meses de tratamento.

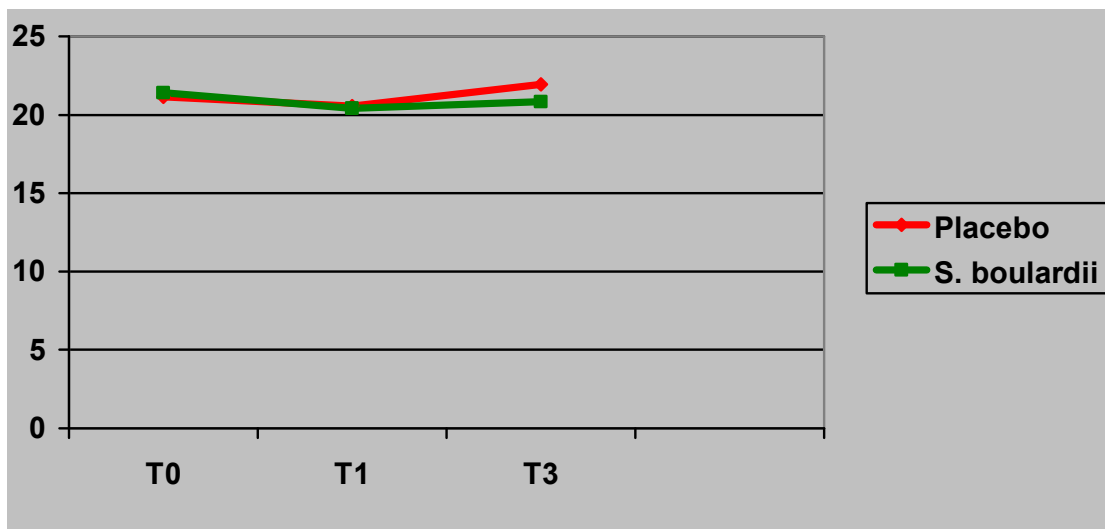
**Tabela 10.** Comparação entre as diferenças das médias da porcentagem de excreção do manitol nos pacientes com DC submetidos ao tratamento com *S. boulardii* e o Placebo por um período de três meses

	N	Médias das diferenças	Desvio-padrão	p
$\Delta\%$ M1-M0				
Placebo	17	+ 0,57	4,06	0,57
<i>S. boulardii</i>	14	- 0,99	3,68	0,33
$\Delta\%$ M3-M0				
Placebo	17	+0,79	3,65	0,39
<i>S. boulardii</i>	14	-0,60	3,19	0,49
$\Delta\%$ M3-M1				
Placebo	17	+1,36	4,26	0,21
<i>S. boulardii</i>	14	-0,39	3,43	0,67

$\Delta\%$  M1-M0: diferença entre as médias das porcentagens de excreção da lactulose entre o final do primeiro mês e o início do tratamento.

$\Delta\%$  M3-M0: diferença entre as médias das porcentagens de excreção da lactulose entre o final do terceiro mês e o início do tratamento.

$\Delta\%$  M3-M1: diferença entre as médias das porcentagens de excreção da lactulose entre o final do terceiro mês e o final do primeiro mês de tratamento.



**Figura 8.** Representação gráfica do comportamento da porcentagem de excreção do manitol em pacientes com DC em uso do Placebo e do *S. boulardii* durante três meses de tratamento.



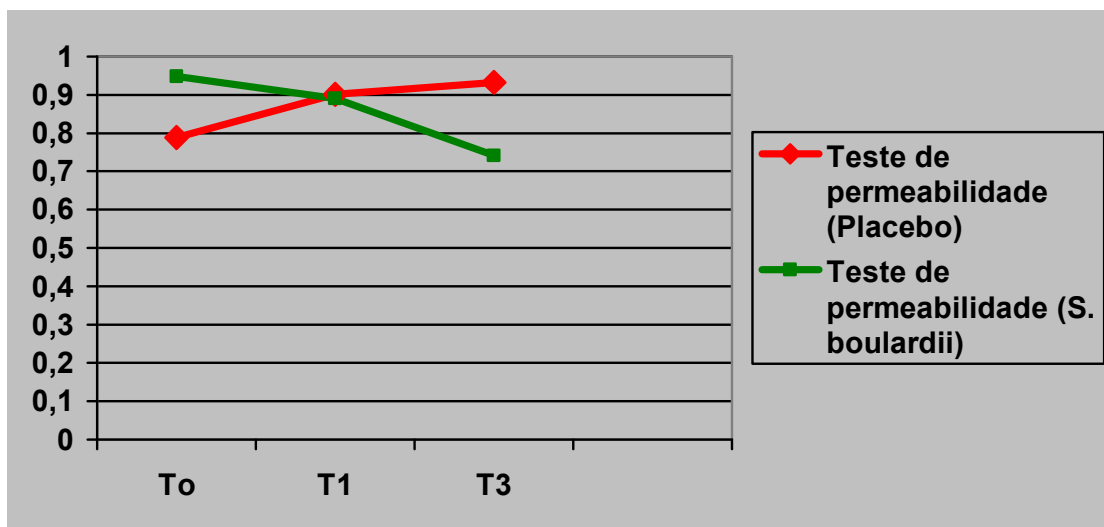
**Tabela 11.** Comparação entre as diferenças das médias da taxa de excreção entre a lactulose e o manitol nos pacientes com DC submetidos ao tratamento com *S. boulardii* e o Placebo por um período de três meses.

	N	Média das diferenças	Desvio-padrão	p
$\Delta \% T_{L/M1} - T_{L/M0}$				
Placebo	17	+0,113	0,253	0,080
<i>S. boulardii</i>	14	-0,055	0,074	0,016
$\Delta \% T_{L/M3} - T_{L/M0}$				
Placebo	17	+0,145	0,409	0,164
<i>S. boulardii</i>	14	-0,175	0,224	0,011
$\Delta \% T_{L/M3} - T_{L/M1}$				
Placebo	17	+0,034	0,435	0,750
<i>S. boulardii</i>	14	-0,118	0,207	0,053

$\Delta \% T_{L/M1} - T_{L/M0}$ : diferença entre as médias da taxa de excreção entre a lactulose e o manitol entre o final do primeiro mês e o início do tratamento.

$\Delta \% T_{L/M3} - T_{L/M0}$ : diferença entre as médias da taxa de excreção entre a lactulose e o manitol entre o final do terceiro mês e o início do tratamento.

$\Delta \% T_{L/M3} - T_{L/M1}$ : diferença entre as médias da taxa de excreção entre a lactulose e o manitol entre o final do terceiro mês e o final do primeiro mês de tratamento.



**Figura 9.** Representação gráfica do comportamento da taxa de excreção entre a lactulose e o manitol em pacientes com DC em uso do Placebo e do *S. boulardii* durante três meses de tratamento.

A porcentagem de excreção da lactulose e a relação entre a excreção da lactulose e do manitol foram comparadas com o escore de pontos do CDAI, separadamente, nos grupos Placebo e *S. boulardii* em T0 e a média da diferença dos seus valores entre T3 e T0 também foram comparados com a média da diferença de pontos do CDAI entre T3 e T0. Como pode ser visto na Tabela 10, não houve correlação entre os resultados.

**Tabela 12.** Correlação entre a porcentagem de excreção da lactulose e a taxa de exceção entre a lactulose e o manitol e o escore de pontos do CDAI e correlação entre a média da diferença dos seus valores entre T3 e T0 com a média da diferença de pontos do CDAI entre T3 e T0.

	Média/diferença das médias	R	R <sup>2</sup>	F-estatística
<b>Grupo placebo</b>				
%L0	16,24	-0,23	0,05	0,81
CDAI0	62,82			
T <sub>LM</sub> 0	0,79	-0,27	0,07	1,18
CDAI0	62,82			
Δ%L3-L0	3,71	-0,12	0,01	0,21
ΔCDAI3-CDAI0	2,64			
Δ% T <sub>LM</sub> 3- T <sub>LM</sub> 0	0,12	0,03	0,05	0,01
ΔCDAI3-CDAI0	2,94			
<b>Grupo <i>S. boulardii</i></b>				
%L0	19,88	0,08	0,01	0,07
CDAI0	50,71			
T <sub>LM</sub> 0	0,95	0,13	0,02	0,19
CDAI0	50,71			
Δ%L3-L0	-3,71	-0,30	0,09	1,23
ΔCDAI3-CDAI0	2,64			
Δ% T <sub>LM</sub> 3- T <sub>LM</sub> 0	-0,14	0,22	0,05	0,60
ΔCDAI3-CDAI0	2,64			

%L0: porcentagem de excreção da lactulose em T0; CDAI0: contagem de pontos do CDAI em T0; T<sub>LM</sub>0: taxa de excreção entre a lactulose e o manitol em T0; Δ%L3-L0: diferença entre as médias das porcentagens de excreção da lactulose entre T3 e T0; ΔCDAI3-CDAI0: diferença entre as médias de contagem de pontos do CDAI entre T3 e T0; Δ% T<sub>LM</sub>3- T<sub>LM</sub>0: diferença entre as médias da taxa de excreção entre a lactulose e o manitol; R: coeficiente de correlação, R<sup>2</sup>: coeficiente de determinação, F-estatística: força estatística.

Uma paciente do grupo Placebo evoluiu com piora clínica após T1 e, preencheu a contagem de pontos do CDAI necessária para caracterização da atividade da doença (175 pontos), enquanto que no grupo *S. boulardii*, não houve manifestação clínica que pudesse estar associada a reativação do DC e, por conseguinte, nenhum paciente preencheu a contagem de pontos do CDAI para caracterização da atividade da doença. A presença de apenas um evento de reativação da doença no grupo Placebo não fornece subsídios para afirmar que os grupos não sejam semelhantes com relação ao desfecho clínico ( $p=1,00$ ). Ao analisar os resultados do teste de permeabilidade intestinal nesta paciente, observa-se que a porcentagem de excreção da lactulose era de 9,1% e se elevou para 18,67% enquanto que a taxa de excreção entre a lactulose e o manitol era de 0,541 e se elevou para 0,801.

## **6 - DISCUSSÃO**

## 6 - DISCUSSÃO

De um modo geral, existem efeitos terapêuticos tão imediatos que seu valor é evidente, por si só, mesmo sem testes formais. No entanto, em sua maioria, tais efeitos são, habitualmente, bem menos dramáticos e, por isso, torna-se necessário testar formalmente idéias sobre tratamentos através da realização de pesquisas clínicas, pois uma variedade de condições – coincidência, comparações errôneas, mudanças espontâneas no curso da doença – podem alterar a verdadeira relação entre tratamento e efeito. Há duas maneiras de se estabelecer os efeitos de tratamentos: estudos observacionais e estudos experimentais, que diferem em sua importância científica e em sua factibilidade. Os estudos terapêuticos observacionais constituem-se em caso especial de estudos prognósticos em geral (estudos de Coorte), no qual o fator prognóstico de interesse é a medida da intervenção terapêutica. Sua principal desvantagem é a susceptibilidade a diferenças sistemáticas nos grupos, que podem determinar conclusões enganosas sobre os efeitos do tratamento. Já o ensaio clínico, é um tipo especial de estudo observacional em que as condições de estudo – seleção dos grupos de tratamento, natureza das intervenções, manejo no acompanhamento e aferição dos desfechos – são especificadas pelo investigador com o objetivo de realizar comparações isentas de viéses. Isola-se a contribuição específica de um fator, mantendo constantes, tanto quanto possível, todos os outros determinantes do desfecho. Ensaios clínicos estruturados após adequada randomização constituem-se em padrão de excelência para estudos científicos dos efeitos de tratamento.

## 6.1- Critérios utilizados para o diagnóstico e a remissão da DC

Para estruturação do nosso ensaio clínico, uma amostra de 31 pacientes com DC, em fase de remissão, definida pelo CDAI, foi randomizada de modo aleatório, com base na Classificação de Viena<sup>112</sup>. O diagnóstico da DC não foi definido por um sinal, sintoma ou exame complementar. Após cuidadosa anamnese e exame físico, os pacientes foram submetidos a exames laboratoriais visando a detecção de alguma má absorção intestinal ou mesmo, de algum sinal inflamatório, através das dosagens da PCR e da velocidade de hemossedimentação. A seguir, realizavam-se exames imaginológicos, tais como o estudo contrastado do intestino delgado, a tomografia computadorizada de abdome, a retossigmoidoscopia e/ou colonoscopia. Através de exames endoscópicos obtinha-se então material para o estudo histopatológico. Sendo, portanto, a DC uma afecção intestinal inflamatória, desprovida de uma etiologia definida até o momento, seu diagnóstico, em todos os pacientes, foi feito após a exclusão de outras causas de inflamação intestinal. Na literatura, vários critérios são aceitos para o diagnóstico da DC, como os critérios de Olmsted County e os critérios de Lennard-Jones<sup>113, 114</sup>. Ambos utilizam-se da presença de manifestações clínicas associadas a achados típicos da DC em exames endoscópicos, radiológicos, histológicos e ainda, eventualmente, em elementos cirúrgicos<sup>115</sup>. Em tese, os critérios adotados pelo Ambulatório de Intestino do HCUFMG são semelhantes aos critérios referidos acima, cabendo ainda explicitar que uma atenção maior é dispensada para determinadas doenças prevalentes em nosso meio, como as enterocolites infecciosas e bacterianas e a strongiloidíase na avaliação dos diagnósticos diferenciais.

Ao contrário do que acontece na prática clínica, onde o acompanhamento dos sinais e sintomas apresentados pelos pacientes geralmente são suficientes para caracterizar ou não a remissão da doença, em uma pesquisa clínica torna-se necessária a

avaliação quantitativa, neste caso, o CDAI. Outros índices, assim como o CDAI, também foram elaborados através de um sistema de contagens de pontos, com o objetivo de integrar as várias formas de manifestação da doença e avaliar o estado de atividade ou remissão da doença. Dentre eles, pode-se citar os índices de Harvey-Bradshaw, van Hees e Talstad<sup>116, 117, 118</sup>. Estes índices diferem entre si, mas, de um modo geral, são baseados em uma combinação de sintomas e achados objetivos ao exame físico e em testes laboratoriais. A variação interobservador e a dificuldade de se avaliar a atividade inflamatória na forma estenosante da doença são características próprias destes índices e diminuem sua sensibilidade e a especificidade. No entanto, quando comparados a outros índices, tais como índices endoscópicos e índices que avaliam desfechos específicos (presença da doença perianal), a praticidade e a experiência em torno dos mesmos favorecem sua utilização<sup>24</sup>. Pode-se também utilizar o questionário da doença inflamatória intestinal, que fornece informações úteis, seja sob o aspecto funcional do intestino, seja sob o aspecto emocional, social ou sistêmico do paciente. Porém, não é específico para DC, como nos mostra seu trabalho original<sup>119</sup>. Além do mais, verifica-se que é pouco prático, pois é bastante extenso.

Alguns marcadores biológicos são também utilizados para se caracterizar a atividade inflamatória na DC. Dentre eles, destacam-se a velocidade de hemossedimentação (VHS) e a proteína C reativa (PCR). Contudo, tais testes apresentam sensibilidade e especificidade baixas. As citocinas e moléculas de adesão são também utilizados como reagentes de fase aguda, mas, assim como o VHS e a PCR, carecem de sensibilidade e de especificidade. Existe ainda a possibilidade de se avaliar a atividade da DC através da marcação radioativa de leucócitos nas fezes e da medida da excreção da calprotectina nas fezes. Contudo, são métodos, até o momento, empregados

apenas em estudos científicos para esta finalidade e não estão disponíveis rotineiramente, o que reduzem, em muito, sua aplicabilidade<sup>120</sup>.

Por fim, a medida do fluxo da artéria mesentérica superior pode ser útil na determinação da atividade ou da remissão da DC<sup>121</sup>. Em nosso meio, este exame não é empregado para tal finalidade e, portanto, deve ser validado em pesquisa científica, antes de sua aplicação na prática clínica. Sabe-se ainda que é operador-dependente e que suas medidas são influenciadas pelo biótipo do paciente. Em obesos, por exemplo, os valores das médias de velocidade do fluxo sanguíneo na artéria mesentérica superior não são fidedignos.

No Brasil, a Portaria SAS/MS nº858, de 04 de Novembro de 2002, que regulamenta o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas sobre DC do Ministério da Saúde, adota a contagem de pontos do CDAI para diferenciação entre atividade e a remissão da DC<sup>122</sup>. Esta padronização também influenciou na escolha deste índice, pois nosso estudo tem como objetivo estudar os pacientes na fase de remissão da doença e, a longo prazo, caso seja comprovado, propor a introdução do *S. boulardii* como medicamento capaz de atuar nessa fase da doença. Sandborn *et al*, após revisão dos índices de atividade da doença, acreditam que o CDAI, por ter sido rigorosamente desenvolvido e validado, é o padrão de excelência para a caracterização dos estágios da DC<sup>123</sup>. No Ambulatório de Intestino do HCUFMG, o CDAI é, atualmente, o mais utilizado e, amplamente realizado desde 1996. Na amostra estudada, o CDAI apresentava uma média de 57,36 pontos e seus valores foram semelhantes quando analisados separadamente por grupo.



## 6.2- Critérios utilizados na randomização dos grupos

A opção de alocar os pacientes de modo aleatório, com base na Classificação de Viena, resultou da necessidade de, em uma investigação clínica envolvendo pacientes com DC, definir subgrupos de pacientes com características distintas e, a seguir, diferenciar pacientes com prognósticos diferentes. Sands afirma que, desse modo, é possível aumentar o poder de investigação de novas terapias e de estudos genéticos<sup>24</sup>. No estudo, predominaram a idade inferior a 40 anos, o acometimento do íleo terminal e o comportamento penetrante da doença. Não se constituíram em parte integrante da casuística os pacientes com DC, cujo local de acometimento era o trato gastrointestinal superior e, exclusivamente, o intestino grosso. Em uma série de 522 pacientes, 78,9% tiveram seu diagnóstico com idade inferior a 40 anos e o íleo terminal estava envolvido exclusivamente em 26,3% dos casos, o cólon isoladamente em 39,4%, o íleo terminal e o cólon, simultaneamente, em 21,9% e, finalmente, o trato digestivo superior em 12,3% dos pacientes. A doença apresentava comportamento não estenosante não penetrante em 27,9% dos pacientes, estenosante em 9,3% e, penetrante em 62,8% dos casos<sup>124</sup>. Quando se comparam essas duas casuísticas, observa-se que a idade e o comportamento da doença apresentaram características semelhantes, mas, a localização da afecção foi bastante diferente entre os dois grupos. Certamente, o número de 31 pacientes é menos representativo e pode associar-se à diferença observada. Contudo, através de estudos genéticos, sabe-se que a heterozigose no gene NOD2/CARD15 não somente associa-se a um maior risco para DC, como também seu mutante R702W relaciona-se com o comportamento estenosante da doença, de acordo com os registros observados na população de doentes de Crohn do noroeste da França<sup>125</sup>. Outras diferenças também poderão ser explicadas por diferentes genótipos, que ainda não foram relatados. Isto significa que, diferenças populacionais determinadas por genótipos supostamente

diferentes podem influenciar na prevalência dos diversos subtipos da classificação de Viena.

Após tratamento estatístico adequado, podemos observar que os grupos Placebo e *S. boulardii*, baseado na classificação de Viena, eram semelhantes entre si e que este viés foi devidamente controlado, antes do início da terapêutica. Ainda com respeito à amostragem, são as características dos pacientes incluídos no estudo que determinam a capacidade de generalização das conclusões aplicadas a outros pacientes. Portanto, os resultados deste estudo não podem ser aplicados aos pacientes cuja DC acomete o trato digestivo superior e o intestino grosso, de modo exclusivo.

Uma vez iniciada a intervenção terapêutica, outras variáveis de confusão foram também comparadas entre os dois grupos. Estes grupos eram semelhantes em relação à medicação utilizada na fase de manutenção da remissão da doença. Da mesma forma, o teste de permeabilidade intestinal apresentava valores semelhantes entre os dois grupos.

A magnitude de seu efeito também deve ser dimensionada. Um único exame foi realizado para mensurar, de modo objetivo, o desfecho principal da intervenção. O teste de permeabilidade intestinal é considerado padrão-ouro para se avaliar a integridade da barreira exercida pela mucosa intestinal e pode ser reproduzido a qualquer momento. Assim sendo, é possível que os fatores que poderiam atuar sobre a amostra, alterando o desfecho da intervenção, foram controlados.

### **6.3- Critérios utilizados para a exclusão de pacientes**

Os critérios de exclusão previamente definidos foram adotados com base nas características especiais de cada grupo. Entre esses, incluem-se os indivíduos com idade inferior a 18 anos, pois não são atendidos no Ambulatório de Intestino do IAG HCUFMG, idosos e mulheres grávidas ou em fase de amamentação também foram

excluídos por se constituírem de um grupo especial de pacientes nos quais o uso do *S. boulardii* não foi extensamente avaliado, nem mesmo para indicações específicas, regulamentadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)<sup>126</sup>. Da mesma forma, pacientes com doença aguda ou crônica concomitante, onde o uso de probiótas tem sido associado a sepse por fungos em pacientes imunocomprometidos, mesmo em casos isolados<sup>127</sup>. Por fim, pacientes com doença renal avançada, pois haveria diminuição das taxas de excreção da lactulose e do manitol o que poderia interferir com os resultados do exame.

Dos 34 pacientes que iniciaram o estudo, 31 completaram o protocolo de tratamento. Dois pacientes que alegaram possíveis efeitos colaterais associados à introdução do tratamento pertenciam ao grupo Placebo. Os pacientes do grupo *S. boulardii* não apresentaram sinais ou sintomas que pudessem ser associados ao uso do princípio ativo. Na literatura revisada, não foi evidenciado registros de efeitos colaterais associados ao uso do *S. boulardii*, exceto em pacientes imunossuprimidos e, ainda a ocorrência de um único caso de fungemia em paciente imunocompetente<sup>128</sup>. Em relação às manifestações clínicas apresentadas pelos dois pacientes do grupo Placebo, torna-se difícil uma correta interpretação, pois os pacientes não procuraram atendimento médico naquela oportunidade. Contudo, a possibilidade de ter ocorrido apenas a não adesão ao tratamento é perfeitamente possível. O terceiro paciente que não completou o protocolo clínico abandonou o tratamento sem esclarecer o motivo de sua decisão e, assim como os dois anteriores, continuaram posteriormente seu acompanhamento no ambulatório.

#### **6.4- Resultados do teste de permeabilidade intestinal em indivíduos saudáveis e em pacientes com DC em fase de remissão**

Neste estudo, os grupos *S. boulardii* e Placebo apresentaram valores semelhantes da taxa de excreção da lactulose, do manitol e da relação entre a excreção de ambos no T0, sendo, portanto, uniformes. Contudo, quando os resultados foram comparados com os resultados do grupo de indivíduos saudáveis, observou-se que a taxa de excreção da lactulose foi 6,6 vezes maior nos pacientes com DC em remissão ( $p= 0,002$ ) e que a relação entre a taxa de excreção da lactulose e do manitol foi 8,6 vezes maior também neste grupo de pacientes ( $p= 0,016$ ). Isto significa que a função de barreira exercida pela mucosa intestinal contra a permeação de antígenos apresentava-se bastante diminuída quando comparada a voluntários saudáveis. Tais alterações podem contribuir para explicar a evolução de caráter recorrente da doença. Com relação à taxa de excreção do manitol, seus valores foram semelhantes, do ponto de vista estatístico, entre os dois grupos. Sabendo que seus valores relacionam-se à superfície absorptiva da mucosa, conclui-se que na DC, a superfície absorptiva da mucosa intestinal, avaliada por este método, é semelhante da mucosa intestinal nos voluntários saudáveis.

Quando os resultados da taxa de excreção da lactulose, do manitol e da relação entre a taxa de excreção dos mesmos nos nossos casos de voluntários saudáveis foram comparados com resultados de controles saudáveis realizados por autores ingleses, verificamos que os números eram diferentes<sup>81, 129, 130</sup>. No trabalho conduzido por Maxton *et al*, a taxa de excreção da lactulose apresentou valores em torno de 0,39% em coleta de urina de 5 horas<sup>130</sup>. No presente trabalho, a mediana da taxa de excreção da lactulose foi de 2,56% em coleta de urina de 6 horas. Se considerarmos o resultado de 5,8% como um “outlier” e refizermos o cálculo, a taxa de excreção da lactulose se reduz para 2,36%, ou seja, 1,97% maior quando comparado com os valores encontrados nos

estudos conduzidos na Inglaterra. Em um outro trabalho realizado na Itália, D'Inca *et al* encontraram um valor médio da taxa de excreção da lactulose de 0,9%, em posição intermediária quando comparada com os dois valores citados acima<sup>131</sup>.

No Brasil, dois autores estudaram a permeabilidade intestinal através da utilização do <sup>51</sup>Cr-EDTA, uma macromolécula, que também utiliza a rota paracelular como via de permeação, tal como acontece com a lactulose<sup>132, 133</sup>. Os resultados obtidos também foram diferentes quando comparados aos estudos europeus utilizando o <sup>51</sup>Cr-EDTA. Enquanto que nos dois estudos brasileiros a mediana e a média da taxa de excreção do <sup>51</sup>Cr-EDTA em urina de 24 horas foi de 3,1% e 3,14%, a média nos outros estudos foi de 1,63%, ou seja, 1,47% a 1,51% maior<sup>52, 130</sup>. Peters *et al* afirmam que os trabalhos publicados sobre permeabilidade intestinal apresentam pouca uniformidade metodológica, tornando as comparações entre os estudos bastante difíceis<sup>134</sup>. Esta afirmação implica que, até que a uniformização ocorra, é importante que o pesquisador estabeleça seu próprio controle e o explicita adequadamente em seus métodos e resultados. Presume-se ainda que, pelo menos em parte, as diferenças observadas entre os resultados dos estudos brasileiros e aqueles da literatura possam ser explicadas por diferenças populacionais, bem como fatores ambientais e dietéticos, facilitando assim a exposição da mucosa a antígenos luminais.

Com relação à taxa de excreção do manitol, os resultados de nossos estudos se aproximaram daqueles encontrados pelos autores ingleses e italianos<sup>81, 129, 135</sup>. Em nossa casuística, a mediana dos valores foi de 23% em urina de 6 horas, enquanto nos estudos ingleses a média foi de 16,7% em urina de 5 horas e no estudo italiano a média foi de 26,7%, em coleta de urina de 6 horas.

Sabendo-se então, que a taxa de excreção da lactulose foi maior e que o valor da taxa de excreção de manitol foi bastante próximo, conclui-se que a relação entre a taxa

de excreção de ambas também foi maior, quando comparado aos mesmos estudos ingleses<sup>81, 129</sup>. Em nossa casuística, a mediana foi de 0,1. Se desconsiderarmos o “outlier”, o resultado passaria para 0,08. A média da relação entre a taxa de excreção de ambos nesses dois estudos realizados na Inglaterra foi de 0,015, ou seja, a diferença entre ambos foi de 0,065. Se comparado ao grupo italiano, no qual a relação entre a taxa de excreção de ambos foi de 0,035, a diferença foi de 0,045<sup>131</sup>.

Assim como aconteceu com os resultados encontrados em voluntários sadios que foram diferentes, sobretudo quando se avaliou a integridade da barreira da mucosa intestinal, o mesmo se verificou com os pacientes com DC em fase de remissão. A mediana da relação entre a excreção da lactulose e do manitol, no nosso estudo, foi de 0,86, enquanto que naqueles realizados na Escócia, esses valores foram de 0,035 em urina de 5 horas<sup>136</sup>. Resultados semelhantes foram evidenciados por Wyatt *et al*, em urina de 5 horas, na Áustria. A média da porcentagem de lactulose foi de 0,5% e do manitol 11,51%. A relação entre eles foi de 0,043, ou seja, valor bem próximo do estudo escocês<sup>107</sup>. É ainda pertinente atentar para o resultado da porcentagem de excreção do manitol, diferente até mesmo de outros trabalhos europeus<sup>81, 129, 130, 136</sup>.

Se considerarmos que esses resultados são realmente diferentes, e que a diminuição da integridade da mucosa intestinal relaciona-se com a intensidade do processo inflamatório, o índice de recaídas no nosso meio seria maior. No entanto, não existem estudos prospectivos que comprovem esta hipótese, até o momento. Por outro lado pode-se também aventar que mecanismos adaptativos ocorram, induzidos por níveis de permeação maior, o que não confirmaria a hipótese de um maior número de recaídas na nossa população.

## **6.5- Aspectos relativos ao estudo da permeabilidade intestinal e ao uso de probiótas na DC**

Sabe-se que a evolução da DC é caracterizada pela ocorrência de reativações, habitualmente imprevisíveis. Informações acerca da história natural dessa doença são escassas, pois os estudos de base populacional também são poucos. Moum *et al* acompanharam 232 pacientes com DC e observaram que em 47% dos casos, houve reativação da doença no primeiro ano após o diagnóstico<sup>137</sup>. Ficou evidenciado também nesse estudo, que em 11% dos pacientes que apresentaram reativação, a evolução foi do tipo crônico recorrente. Em 1995, Munkholm *et al*, avaliaram os aspectos evolutivos de 373 pacientes com DC e observaram que a taxa de reativação da doença nos primeiros dois anos de diagnóstico relacionou-se com a taxa de recidivas nos cinco anos subsequentes<sup>138</sup>. Nesse mesmo estudo observou-se que, durante um período de quatro anos, 22% dos pacientes mantiveram-se em remissão; em 25% dos casos, a doença comportou-se como crônica ativa e, em 53%, a evolução alternou-se entre períodos de atividade e períodos de remissão. No grupo de pacientes com doença em remissão, 80% manteve-se assintomático no ano seguinte. Em outro estudo, um total de 150 pacientes foram separados segundo a classificação de Viena e seus dados coletados por um período de 20 anos<sup>139</sup>. O número de pacientes cuja doença apresentava comportamento estenosante permaneceu inalterado, enquanto que em 37 pacientes, cuja classificação inicial foi taxada de não estenosante não penetrante, foram reclassificados como do tipo estenosante (n= 14) e do tipo penetrante (n= 23). Esta mudança ocorreu na primeira década de seguimento, sugerindo que o comportamento clínico da doença é dinâmico e seu fenótipo se altera ao longo dos anos. Diante desses dados, torna-se presumível que o tempo de seguimento de três meses seja curto para se avaliar o número de recidivas; contudo, sua ocorrência foi verificada em uma paciente do grupo

Placebo e não foi observada nos pacientes do grupo *S. boulardii*, e será comentado adiante.

Ainda que as informações sobre a história natural da DC sejam restritas, menos ainda conhecemos o comportamento da permeabilidade intestinal. Embora as flutuações na permeabilidade possam ocorrer espontaneamente, existe uma tendência de normalização das medidas de permeabilidade durante as remissões, assim como níveis mais elevados são observados em grupos de pacientes com maior possibilidade de recaída clínica<sup>131, 140</sup>. No entanto, na literatura consultada, os trabalhos tentam prever a evolução da doença sem a realização de testes seriados<sup>107, 136, 141</sup>. Um estudo, em cuja metodologia fosse empregado o teste de permeabilidade intestinal, de maneira prospectiva e seriada, seria bastante útil para a análise de seu comportamento e definitiva associação com as reativações da doença.

Para se avaliar os efeitos do uso do *S. boulardii*, o teste de permeabilidade intestinal foi realizado de modo seriado, em T0, T1 e T3. Enquanto a diferença das médias da taxa de excreção da lactulose entre T1 e T0 se reduziu em 2,11 no grupo *S. boulardii* (p= 0,008), no grupo controle aumentou em 2,7 (p= 0,09). Entre T3 e T0, foi confirmado essas tendências. A taxa de excreção da lactulose do grupo *S. boulardii* se reduziu em 3,84 (p= 0,017), e no grupo Placebo se elevou em 3,83 (p= 0,16). No intervalo entre T3 e T1, a diminuição da taxa de excreção da lactulose de 1,79, no grupo *S. boulardii*, não foi significativa, da mesma forma que o aumento na taxa de excreção no grupo Placebo de 1,24. Assim, no grupo *S. boulardii*, a taxa inicial de excreção da lactulose que foi 19,88%, se reduziu para 16,04%, o que representou uma queda de 19,3% (p< 0,05), enquanto que, no grupo controle, a taxa de excreção de lactulose que foi de 16,3% em T0, elevou-se para 20,13%, o que significou um aumento de 19% (p>0,05). Através destes resultados, pode-se afirmar que o uso do *S. boulardii*, como



medicamento adjuvante da terapia de manutenção dos pacientes com DC em fase de remissão, influenciou na diminuição da permeação da lactulose. Já no grupo Placebo, a permeação à lactulose não se alterou do ponto de vista estatístico, utilizando-se dos mesmos medicamentos empregados no grupo *S. boulardii* nessa fase da doença. No entanto, pode-se concluir que houve pelo menos, uma tendência de piora, baseado no valor de p de 0,16, que poderia ter sido menor se não tivesse ocorrido uma variação tão grande evidenciada através do desvio-padrão de 10,79. Tais fatos caracterizam o grupo Placebo como uma amostra heterogênea, ao contrário do grupo *S. boulardii*, no qual o desvio-padrão foi de 5,25, sendo portanto, homogêneo. Pode-se inferir, ainda, que se a amostra do grupo Placebo fosse maior, teríamos um grupo menos heterogêneo e assim, o desvio-padrão poderia ser menor e o valor de 3,83 (diferenças entre T3 e T0) observado neste grupo, que difere apenas em uma casa centesimal do valor 3,84 observado no grupo *S. boulardii*, também, poderia ter significância estatística.

No que se refere às diferenças das médias da relação da excreção entre a lactulose e o manitol, no grupo *S. boulardii*, houve uma queda de 0,055 entre T1 e T0 ( $p=0,016$ ), queda de 0,175 entre T3 e T0 ( $p=0,011$ ), enquanto que no grupo Placebo houve uma elevação de 0,113 entre T1 e T0 ( $p=0,08$ ) e de 0,145 entre T3 e T0 ( $p=0,16$ ). Entre T3 e T1, a redução da relação da excreção entre a lactulose e o manitol foi de 0,118 ( $p=0,053$ ) para o grupo *S. boulardii*, e no grupo Placebo houve um aumento de 0,034 ( $p=0,75$ ). No grupo *S. boulardii*, a relação entre a taxa de excreção da lactulose e o manitol foi de 0,95 em T0 e de 0,775 em T3, o que representa uma queda de 19,4% ( $p<0,05$ ). No grupo Placebo, a relação da excreção entre a lactulose e o manitol foi de 0,79 em T0 e de 0,935 em T3, o que equivale a um aumento de 18,1% ( $p>0,05$ ). Tais valores confirmam os resultados da taxa de excreção da lactulose e, assim, pode-se afirmar que o uso do *S. boulardii* reduziu a relação entre a taxa de excreção da lactulose

e do manitol, ou seja, permitiu uma melhora da função de barreira exercida pela mucosa intestinal contra a permeação de antígenos. De maneira semelhante com o que aconteceu com a taxa de excreção da lactulose no grupo Placebo, a relação entre a taxa de excreção da lactulose e do manitol neste grupo apresentou desvio-padrão elevado (0,409), o que minimizou o poder estatístico dos seus valores. No grupo *S. boulardii*, o desvio-padrão foi de 0,224.

Por último, as diferenças das médias da porcentagem de excreção do manitol foram equivalentes entre os dois grupos, seja entre T1 e T0, T3 e T0 e T3 e T1. Consequentemente, pode-se afirmar que o uso do *S. boulardii* não interferiu com as taxas de excreção do manitol, o que já era esperado. As taxas de excreção do manitol entre os pacientes com DC em fase de remissão e o grupo controle também foram equivalentes. Isto significa que a superfície absorptiva da mucosa intestinal destes pacientes permaneceu inalterada durante o período de seguimento. A utilização do manitol como parte integrante do teste de permeabilidade intestinal tem como principal objetivo anular os efeitos que as variações do esvaziamento gástrico, ou mesmo do tempo de trânsito intestinal, possam exercer sobre os resultados finais do exame<sup>51</sup>. Portanto, presume-se que estes valores deveriam manter-se estáveis, a não ser que ocorressem ressecções cirúrgicas, ou mesmo o aparecimento de lesões ulceradas e extensas nos intestinos dos pacientes, o que provavelmente não ocorreu.

Sabe-se, atualmente, que existem várias evidências indiretas que os componentes da flora do íleo terminal e do cólon contribuem para a patogênese da DC. Enquanto a concentração bacteriana no lúmen intestinal alcança o número de  $10^7$  a  $10^8$  unidades formadoras de colônias (UFC)/g de conteúdo luminal no íleo terminal, este número é de  $10^{11}$ UFC/g no intestino grosso. Estas regiões, onde a população de bactérias anaeróbicas é mais alta, são preferencialmente acometidas pela DC. Em situações nas quais é

realizado um desvio cirúrgico do trânsito intestinal, ocorre a remissão da DC e, quando se restabelece sua continuidade, observa-se recorrência, de modo reprodutível<sup>142, 143</sup>. Tais evidências sugerem que o conteúdo luminal funciona como fator estimulante para inflamação intestinal. Contribui, ainda, o aumento das concentrações de espécies de *Enterobacteriaceae* e *Bacteróides*, que aderem e invadem a mucosa de pacientes com DC, especialmente em áreas adjacentes a úlceras e fístulas e a susceptibilidade genética em um subgrupo de pacientes com DC, caracterizada pelo polimorfismo no gene NOD2/CARD15, que determina o receptor citoplasmático para o dipeptídeo muramil (componente peptidoglicano presente na membrana celular bacteriana)<sup>30, 144, 145</sup>. Tal alteração genética causa ativação defectiva do fator nuclear  $\kappa \beta$  que resulta em um clearance epitelial diminuído. Os pacientes com DC ainda apresentam alterações na composição bacteriana comensal entérica com aumento de *Bacteroides*, cepas aderentes e invasivas de *E. coli*, *Enterococci*, e diminuição de espécies de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*<sup>146</sup>. Por fim, Rath *et al* e Sellon *et al* estudando a microflora intestinal de camundongos, mostraram que determinadas espécies de bactérias comensais entéricas apresentam a propriedade de induzir colite mediada imunologicamente e que, a resposta inflamatória depende de fatores relacionados ao hospedeiro<sup>147, 148</sup>. Estes resultados sugerem que o conteúdo luminal promove uma estimulação antigênica em pacientes com DC. Contudo, a predisposição genética assume papel importante na resposta imunológica e que o equilíbrio entre uma microbiota intestinal benéfica versus agressiva determina a homeostase ou inflamação da mucosa. Este elemento conceitual possibilita a utilização de probióticos na terapêutica da DC.

Durante anos, os mecanismos propostos para explicar os efeitos benéficos dos probióticos estiveram concentrados no seu poder de suprimir o crescimento de microrganismos patogênicos. De fato, o equilíbrio microbiológico envolvendo a

competição entre probiótas e bactérias patogênicas por sítios específicos no epitélio intestinal constituía-se no seu principal mecanismo de ação<sup>149</sup>. Contudo, recentemente, tem sido sugerido o efeito modulador dos probiótas e de suas secreções na resposta imune adaptativa ou não do hospedeiro. Kadowaki *et al* demonstraram que tanto as células epiteliais quanto as células imunológicas possuem a capacidade de discriminar diferentes espécies de microrganismos<sup>150</sup>. Ao nível da barreira mucosa, as células epiteliais expostas ao *Streptococcus thermophilus* e ao *Lactobacillus acidophilus* aumentam a fosforilação da actina e da ocludina nas junções firmes, com isso, impedem a adesão e a invasão da *E. coli* enteroinvasiva<sup>151</sup>. Ao nível do sistema imunológico entérico, as células epiteliais secretam interleucina-8 em resposta a bactérias como a *E. coli*, mas não o fazem na presença de probiótas<sup>152</sup>. Com relação à imunidade sistêmica, a administração de probiótas, por via oral, altera a imunidade em sítios distantes da mucosa intestinal, incluindo trato genital feminino, trato respiratório, pele e orofaringe. Cepas específicas de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* têm sido utilizados com sucesso no tratamento e prevenção de dermatite e eczemas em crianças e adolescentes<sup>92,153</sup>.

Com relação ao *S. boulardii*, suas propriedades biológicas são determinadas por:

- a) manter a vitalidade após liofilização;
- b) atingir altas concentrações no intestino, quando administrado por via oral, mas sem haver colonização;
- c) apresentar conteúdo não inferior a 1 milhão de microorganismos por cápsulas de 50mg;
- d) sintetizar vitaminas do complexo B;
- e) estimular defesas anti-infecciosas não específicas, tais como o sistema de complemento e o sistema retículo endotelial<sup>154, 155</sup>.

Sua utilização na diarreia aguda em crianças e na prevenção de diarreia associada ao uso de antimicrobianos está bem estabelecida<sup>156</sup>. Em 1998, Péret Filho estudou o efeito da administração oral de diferentes doses de *S. boulardii* a camundongos convencionais tratados com ciclofosfomida e verificou que a hipotrofia vilositária, a lesão na orla em

escova e a translocação bacteriana foi significativamente menor no grupo que utilizou o probióta, quando comparado aos grupos que não receberam o *S. boulardii*<sup>157</sup>. Este resultado sugere o efeito protetor do *S. boulardii* sobre a mucosa intestinal. Na literatura consultada, existem evidências que determinadas espécies de probiótas podem atuar de maneira benéfica em pacientes com doença inflamatória intestinal, contudo os estudos são em número reduzido. Os melhores resultados têm sido obtidos na pouchite e na retocolite ulcerativa<sup>146</sup>. Na DC, os resultados são conflitantes e a permeabilidade intestinal foi avaliada em apenas um estudo<sup>158</sup>.

Plein *et* Hotz avaliaram os efeitos terapêuticos do *S. boulardii* em 20 pacientes com DC oligossintomáticos, mas que apresentavam diarreia<sup>159</sup>. O estudo foi randomizado, duplo-cego e placebo/controle. A dose utilizada de *S. boulardii* foi de 250mg três vezes ao dia. Os medicamentos em uso foram mantidos. Após sete semanas de tratamento, o grupo *S. boulardii* apresentou redução do número de evacuações e também houve diminuição da contagem de pontos do índice BEST, ao contrário do grupo controle ( $p < 0,01$ ). Os pacientes ainda foram acompanhados por mais três semanas após a interrupção do uso *S. boulardii* e, neste período, houve recrudescência dos sintomas. Nenhum efeito colateral foi observado.

Em um segundo estudo, no qual foi utilizado também o *S. boulardii*, os autores concluíram que o probióta foi útil no tratamento de manutenção da DC<sup>160</sup>. Trinta dois pacientes com DC em remissão, definida pelos critérios do CDAI com contagem de pontos menor do que 150, foram randomizados aleatoriamente em dois grupos de 16 pacientes. A DC acometia o íleo, o cólon ou ambos. No primeiro grupo, os pacientes receberam mesalazina, preparada em microgrânulos de etilcelulose, na dose de 500mg duas vezes ao dia e no segundo grupo, além da mesalazina, foi prescrito o *S. boulardii* na dose de 500mg duas vezes ao dia. O tempo de acompanhamento foi de seis meses.

No primeiro grupo, foram registradas seis recaídas da doença, enquanto que no segundo grupo, houve apenas uma recorrência ( $p=0,04$ ).

Outros estudos também avaliaram a eficácia da utilização de probiótas na DC, mas, através de espécies diferentes. Malchow utilizou a cepa não-patogênica *E. coli* Nissle 1917, sorotipo 06:K5:H1, no pressuposto de que esta cepa, a longo prazo, pudesse suprimir outras cepas patogênicas, competindo por substratos, vitaminas e fatores de crescimento<sup>161</sup>. Vinte e oito pacientes com DC, inicialmente em atividade, com o acometimento restrito ao intestino grosso, foram tratados com prednisolona na dose de 60mg/dia na primeira semana e, a seguir, a dose foi reduzida em 10mg, semanalmente, até atingir 30mg, e depois, a dose foi reduzida em 5mg à cada semana, até o total de 10mg. Após um mês, a dose foi reduzida para 5mg e, depois de mais um mês, foi suspensa. Na eventualidade de piora clínica, a dose do corticóide foi aumentada. Ao mesmo tempo, 16 pacientes receberam  $2,5 \times 10^9$  bactérias viáveis de *E. coli* Nissle 1917, sorotipo 06:K5:H1, por cápsula durante um ano. Os outros 12 pacientes receberam placebo. A taxa de indução de remissão foi semelhante entre os dois grupos, contudo, todos os pacientes que receberam a *E. coli* interromperam o corticóide até o sexto mês, ao contrário do grupo Placebo, no qual alguns pacientes mantiveram-se corticóide-dependentes. Enquanto no grupo *E. coli* 33,3% dos pacientes apresentaram recaída clínica após um ano de tratamento, no grupo placebo esta porcentagem foi de 63,6% ( $p < 0,05$ ).

A partir de 2002, outros estudos foram realizados, sendo utilizado o *Lactobacillus GG* e, em sua maioria, os resultados não comprovaram a utilidade do emprego deste probióta na fase remissão da DC. Prantera *et al* acompanharam 37 pacientes com DC durante um ano, em fase de remissão induzida cirurgicamente<sup>162</sup>. O CDAI foi adotado para definição da remissão da doença. Na maioria dos pacientes, a

DC localizava-se no íleo (77,8%). O íleocolon estava acometido em 15,5%, e o cólon, isoladamente, em 6,7% dos pacientes. Da mesma forma dos estudos anteriores, foi realizada a randomização aleatória e os grupos foram semelhantes entre si. A dose de *Lactobacillus* GG foi de 6 bilhões de UFC duas vezes ao dia. A recorrência da doença foi observada em 16,6% dos pacientes no grupo *Lactobacillus*, tendo sido observada uma recorrência na semana 24, uma na semana 29 e outra na semana 46. No grupo Placebo, houve duas recaídas, sendo um na semana 13 e outra na semana 15. Portanto, ao final de 12 meses de tratamento, o índice de recaídas foi o mesmo em ambos os grupos. Bousvaros *et al* estudaram o efeito do *Lactobacillus* GG em crianças na fase de remissão da DC<sup>163</sup>. Foram incluídas 75 crianças e os medicamentos utilizados na fase de remissão foram mantidos. O *Lactobacillus* GG foi usado em 39 pacientes e o Placebo em 36. O tempo de acompanhamento foi de dois anos. O tempo médio de recaída foi de 9,8 meses no grupo *Lactobacillus* GG e de 11 meses no grupo Placebo. No grupo *Lactobacillus* GG, 31% evoluíram com recaída, enquanto que no grupo Placebo o índice de recaída foi de 17%. Os autores foram levados a admitir que o *Lactobacillus* GG não prolongou a fase de remissão da doença.

Em síntese, os dois estudos que utilizaram o *S. boulardii* apresentaram resultados favoráveis<sup>159, 160</sup>. Em ambos, o probióta foi acrescentado à prescrição, sendo mantidos os medicamentos usados na fase de remissão. No estudo em que foi utilizado o *E. coli* Nissle, seu desenho foi um pouco diferente, pois os pacientes estavam em uso de corticóide para tratamento da atividade da doença<sup>161</sup>. No entanto, seu efeito benéfico foi constatado na fase de remissão da doença, uma vez que o índice de corticóide-dependência foi maior no grupo controle e o índice de recaída foi menor no grupo que utilizou o probióta. Com referência aos estudos que utilizaram o *Lactobacillus* GG, os resultados não evidenciaram benefícios na fase de remissão da doença<sup>162, 163</sup>. No

primeiro estudo, Pranter *et al* selecionaram um grupo específico de pacientes com DC, nos quais a remissão foi alcançada através do tratamento cirúrgico e o probióta foi utilizado isoladamente nestes pacientes<sup>162</sup>. No segundo estudo, realizado em crianças com DC, o *Lactobacillus* GG foi utilizado em associação com os medicamentos prescritos na fase de remissão e, ainda assim, o tempo médio de recaída e o número de recaídas foi o mesmo nos dois grupos<sup>163</sup>.

Diante de tais evidências, pode-se afirmar que os resultados obtidos com o *S. boulardii* e o *E. coli* Nissle foram superiores aqueles obtidos com o uso do *Lactobacillus* GG. No entanto, acreditamos que estes dados não nos parecem suficientes para a adoção na prática clínica, pois as amostras são pequenas e diferentes entre si. As doses foram também diferentes de um estudo para o outro. Ensaio clínico maiores, preferencialmente multicêntricos, definiriam as dúvidas ainda existentes.

Na revisão bibliográfica por nós realizada, não encontramos qualquer estudo sobre a influência da utilização de probiótas na permeabilidade intestinal de pacientes com DC em fase de remissão. Observamos apenas um estudo, no qual foi usado o *Lactobacillus* GG em quatro crianças com DC em atividade e a resposta terapêutica foi avaliada através do teste de permeabilidade intestinal<sup>158</sup>. O estudo foi aberto e as medicações que já vinham sendo utilizadas foram mantidas (prednisolona, azatioprina e metronidazol). Foi prescrito a dose de 10<sup>10</sup> UFC duas vezes ao dia durante seis meses e o teste de permeabilidade foi realizado nas semanas 0, 1, 4, 12 e 24. Para realização do teste foi empregado a celobiose, como macromolécula e o manitol, como micromolécula. Em todos os quatro pacientes, observou-se redução da taxa de excreção da celobiose até a semana 24, o que sugere que o *Lactobacillus* GG melhorou a função de barreira exercida pela mucosa intestinal neste período. No entanto, na semana 48, houve aumento na taxa de excreção da lactulose. Foi observado ainda que, em um



período de quatro a 12 semanas após a descontinuidade do *Lactobacillus GG*, três pacientes evoluíram com reativação da doença, sendo necessária a realização de colectomia em um e de ressecção ileocecal em outro.

O teste de permeabilidade intestinal, apesar de não ser um exame de rotina na prática clínica, tornou-se um método útil para monitorização terapêutica de várias doenças intestinais, caracterizadas pelo aumento da permeabilidade da mucosa, como a DC. Apesar da causa da doença ser desconhecida, várias evidências sugerem que a microbiota digestiva possui papel importante na iniciação e na manutenção da doença e que a resposta inflamatória intestinal seja resultado de uma resposta anormal do hospedeiro a bactérias intestinais ou a seus componentes, em indivíduos geneticamente predispostos<sup>165, 166</sup>. O elo entre os dois ambientes, lúmen e mucosa intestinal, seria o defeito na função de barreira exercida pela mucosa, permitindo que antígenos bacterianos presentes na luz intestinal iniciem ou mesmo mantenham a inflamação crônica de caráter recidivante. Diante do exposto, pode-se afirmar que a melhora da função de barreira exercida pela mucosa implicaria na redução à permeação de antígenos e, conseqüentemente, na diminuição da reação inflamatória. Assim sendo, através do teste de permeabilidade intestinal, pode-se obter informações sobre a dinâmica do processo que acontece entre os antígenos presentes na luz intestinal e a mucosa. Dessa forma, podemos afirmar também que, se um determinado medicamento é capaz de melhorar a permeabilidade intestinal, pode ele também proporcionar benefícios clínicos no tratamento de doenças intestinais que se caracterizam pelo aumento da permeabilidade, como ficou demonstrado.

Suenaert *et al* realizaram estudo semelhante ao nosso, utilizando infliximabe<sup>166</sup>. Este trabalho foi aberto e incluiu 33 pacientes com DC em atividade, definida pela contagem de pontos do CDAI maior que 150 pontos. Os pacientes foram submetidos ao

estudo da permeabilidade intestinal através da dosagem do  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  na urina de 24 horas imediatamente antes do uso do infliximabe, na dose de 5mg/kg, e, quatro semanas depois. O aumento da permeabilidade intestinal constatado nestes pacientes antes do tratamento reduziu de modo significativo e os autores concluíram que, a inibição do FNT diminuiu a inflamação da mucosa destes pacientes e melhorou a função de barreira exercida pela mucosa intestinal. Afirmaram ainda que o FNT exerce um papel central na modulação do processo inflamatório na mucosa dos pacientes com DC.

Em nosso ensaio clínico foi realizado também o levantamento da remissão ou não da doença, através da contagem de pontos do CDAI, em T0, T1 e T3. O comportamento do índice do CDAI foi comparado com o comportamento do teste de permeabilidade intestinal. Tanto no grupo Placebo, quanto no grupo *S. boulardii*, não houve correlação entre os dois parâmetros. Sabe-se que o teste de permeabilidade intestinal é capaz de detectar alterações que, por sua vez, resultam de eventos que ocorrem ao nível da mucosa. Um critério como CDAI e outros existentes, não têm essa característica. Tendo por base nossos resultados, entendemos que o teste de permeabilidade é o método mais acurado para monitorização da resposta terapêutica. No entanto, acreditamos que seus resultados, a princípio, não devem se sobrepor às decisões clínicas. Situação semelhante ocorre com os exames endoscópicos. Habitualmente, a endoscopia não é utilizada de modo isolado para definir a atividade ou não da doença inflamatória. O teste de permeabilidade intestinal permite obter uma visão funcional da barreira exercida pela mucosa do intestino delgado. Neste nível, o resultado de alterações bioquímicas e histológicas que são fornecidas pelo teste pode ou não ter representação clínica imediata. O que se procura é relacionar as medidas deste exame com a predição da atividade da doença, mas faltam estudos prospectivos, utilizando-se de testes seriados, como anteriormente foi mencionado.

Por fim, é importante comentar sobre a evolução de um único caso, em que a paciente evoluiu com critérios de reativação da doença entre T1 e T3. O CDAI inicial era de 110 pontos e no terceiro mês passou para 175 pontos. Assim como o CDAI, a taxa de excreção da lactulose e a relação entre a taxa de excreção da lactulose e do manitol também se alteraram de modo consistente. A primeira aumentou em 105%, enquanto a segunda aumentou em 48%. Isto significa que, determinadas alterações na permeabilidade intestinal podem não ter repercussão clínica imediata, mas quando há evidência de alteração do comportamento da doença, o teste de permeabilidade intestinal é capaz de detectar. No que respeita aos valores da taxa de excreção da lactulose (18,67%) e da relação entre a excreção da lactulose e do manitol (0,801), em T3, quando comparada com os resultados de outros pacientes, observa-se a existência de valores maiores. Contudo outros pacientes não evoluíram para atividade da doença. Desde que tais resultados sejam verdadeiros, pode-se afirmar que, ao se utilizar o teste de permeabilidade intestinal de modo seriado, as informações acerca da possível evolução da doença podem ser mais fidedignas. Por outro lado, é lícito levantar a hipótese, também, de que o tempo de acompanhamento foi curto, e por isso os pacientes que apresentaram valores maiores não evoluíram com piora clínica. Esta segunda hipótese torna-se menos provável, pois o valor da média e da mediana de todos os pacientes com DC incluídos neste estudo foi de 17,92% e 16,80%, ou seja, semelhantes em relação ao resultado obtido da paciente que apresentou a reativação da doença.

## **7 - CONCLUSÕES**

## 7 – CONCLUSÕES

- a) A utilização do *S. boulardii* reduziu as taxas de excreção da lactulose e a relação da excreção entre a lactulose e o manitol e, assim, melhorou a permeabilidade intestinal dos pacientes com DC em fase de remissão;
- b) os pacientes com DC, em fase de remissão, apresentam alterações importantes da integridade da mucosa intestinal, analisada através do teste de permeabilidade;
- c) a integridade da mucosa intestinal dos pacientes com DC em fase de remissão melhorou, mas não se normalizou após a utilização do *S. boulardii*;
- d) o comportamento do teste de permeabilidade intestinal não se correlacionou com a contagem de pontos do CDAI;
- e) a utilização do *S. boulardii* não influenciou no comportamento clínico dos pacientes com DC em fase de remissão, durante o período de acompanhamento de três meses.

## **8 – PROPOSTAS DE ESTUDO**

## 8 - PROPOSTAS DE ESTUDO

- a) Como foi evidenciado nesse estudo, os pacientes com doença de Crohn apresentam importantes alterações dos níveis de permeação à lactulose e, conseqüentemente da relação entre a taxa de excreção da lactulose e do manitol. Torna-se assim, fundamental avaliar se essas alterações influenciam no comportamento clínico da doença e para tal, é nossa proposta realizar o seguimento clínico desses pacientes por um período de tempo maior;
- b) uma vez que foi demonstrado a influência do uso de *S. boulardii* nos pacientes com DC em fase de remissão em um estudo com 31 pacientes, continuaremos esse trabalho com a inclusão de novos pacientes para que a amostra possa ser mais representativa;
- c) caso os resultados continuem favoráveis ao uso do *S. boulardii*, avaliaremos o emprego desse probióta como medicamento isolado na terapêutica de manutenção dos pacientes com DC;
- d) O teste de permeabilidade é útil também para outras afecções e se constitui em método apropriado para ser empregado em várias pesquisas. Estudos com a utilização do mesmo estão sendo desenvolvidos em pacientes com doença celíaca e em pacientes submetidos ao transplante de medula óssea.

## **9 - REFERÊNCIAS**



## 9 - REFERÊNCIAS \*

1. Hollander D, Vadheim CM, Brettholz E, Petersen GM, Delahunty T, Rotter JJ. Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives: a possible etiologic factor. *Ann Intern Med* 1986; 105 (6): 883-5.
2. Katz KD, Hollander D, Vadheim C, McElrie C, Delahunty T, Dadufalza UD, *et al.* Intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. *Gastroenterology* 1989; 97 (4): 927-31.
3. Moum B, Ekbom A, Vatn MH, Aadland E, Sauar J, Lygren I, *et al.* Inflammatory bowel disease: reevaluation of the diagnosis in a prospective population based study in south eastern Norway. *Gut* 1997; 40 (3): 328-72.
4. Pinchbeck BR, Kirdeikis J, Thomson AB. Inflammatory bowel disease in northern Alberta. An epidemiologic study. *J Clin Gastroenterol* 1988; 10 (5): 505-15.
5. Martinez-Salmeron JF, Rodrigo M, de Teresa J, Nogueras F, Garcia-Monteiro M, da Sola C, *et al.* Epidemiology of inflammatory bowel disease in the province of Granada, Spain: a retrospective study from 1979 to 1988. *Gut* 1993; 34 (9): 1207-9.
6. Ranzi T, Bodoni P, Zambelli A, Politi P, Lupinacci G, Campanini MC, *et al.* Epidemiological aspects of inflammatory bowel disease in a north Italian population: a 4-year prospective study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996; 8(7): 657-61.
7. Kurata JH, Kantor-Fish S, Frankl H, Godby P, Vadheim CM. Crohn's disease among ethnic groups in a large health maintenance organization. *Gastroenterology* 1992; 102 (6): 1940-8.
8. Nunes GC, Ahlquist RE, Jr. Increasing incidence of Crohn's disease. *Am J Surg* 1983; 145 (5): 578-81.
9. Sonnenberg A, McCarty DJ, Jacobsen SJ. Geographic variation of inflammatory bowel disease within the United States. *Gastroenterology* 1991; 100 (1): 143-9.
10. Morita N, Toki S, Hirohashi T, Minoda T, Ogawa K, Kono S, *et al.* Incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in Japan: nationwide epidemiological survey during the year 1991. *J Gastroenterol* 1995; 30 (suppl 8): 1-4.
11. Yoshida Y, Murata Y. Inflammatory bowel disease in Japan: studies of epidemiology and ethiopathogenesis. *Med Clin North Am* 1990; 74 (1): 67-90.

---

\*Referências de conformidade com as normas internacionais recomendadas por: ICJE – International Committee of Medical Journals Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. Vancouver: ICMJE, 2001. Disponível em: <http://www.icmje.org>.

12. Eason RJ, Lee SP, Tasman-Jones C. Inflammatory bowel disease in Auckland, New Zealand. *Austr N Z J Med* 1982; 12 (2): 125-31.
13. Anseline PF. Crohn's disease in the Hunter Valley region of Australia. *Austr N Z J Med* 1995; 65 (8): 564-9.
14. Wright JP, Froggatt J, O'Keefe EA, Ackerman S, Watermeyer S, Louw J, *et al.* The epidemiology of inflammatory bowel disease in Cape Town 1980-1984. *S Afr Med J* 1986; 70 (1): 10-5.
15. Souza MH, Troncon LE, Rodrigues CM, Viana CFG, Onofre PHC, Monteiro RA, *et al.* Trends in the occurrence (1980-1999) and clinical features of Crohn's disease and ulcerative colitis in university hospital in southeastern Brazil. *Arq Gastroenterol* 2002; 39 (2): 98-105.
16. Gaburri PD, Chebli JM, de Castro LE, Ferreira JO, Lopes MH, Ribeiro AM, *et al.* Epidemiology, clinical features and evolution of Crohn's disease: a study of 60 cases. *Arq Gastroenterol* 1998; 35 (4): 240-6.
17. Steinwurz F, Sceinberg MA. Serologic diagnosis of inflammatory bowel disease (ASCA and ANCA): evaluation of 70 cases. *GED* 2001; 20 (2): 41-2.
18. Faria LC, Ferrari MLA, Cunha AS. Clinical characteristics of Crohn's disease in a reference center for bowel diseases. *GED* 2004; 23 (15): 151-164.
19. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998; 115 (1): 182-205.
20. Duchmann R, May E, Heike M, Knolle P, Neutath M, Meyerzum Bushenfelle KH. T cell specificity and cross reactivity towards enterobacteria, bacteroides, bifidobacterium, and antigens from resident intestinal flora in humans. *Gut* 1999; 44 (6): 812-8.
21. Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000; 85 (1): 9-18.
22. Strober W, Ludviksson BR, Fuss IJ. The pathogenesis of mucosal inflammation in murine models of inflammatory bowel disease and Crohn disease. *Ann Intern Med* 1998; 128 (10): 848-56.
23. Binder V. Genetic epidemiology in inflammatory bowel disease. *Dig Dis* 1998; 16 (6): 351-5.
24. Sands BE. Crohn's disease. *In: Feldman M, Friedman LS, Sleisenger MH eds. Gastrointestinal and liver disease. Pathophysiology/Diagnosis/Management.* Philadelphia: WB Saunders Company, 2002: 2005-38.

25. Bayless TM, Tokayer AZ, Polito JM 2nd, Quaskey SA, Mellits ED, Harris ML. Crohn's disease: concordance for site and clinical type in affected family members-potential hereditary influences. *Gastroenterology* 1996; 111 (3): 573-9.
26. Colombel JF, Grandbastien B, Gower-Rosseau C, Plegat S, Evrard JP, Dupas JL, *et al.* Clinical characteristics of Crohn's disease in 72 families. *Gastroenterology* 1996; 111 (3): 604-7.
27. Polito JM 2nd, Rees RC, Childs B, Mendeloff AI, Harris ML, Bayless TM. Preliminary evidence for genetic anticipation in Crohn's disease. *Lancet* 1996; 347 (9004): 798-800.
28. Heresbach D, Gulwani-Akolkar B, Lesser M, Alkolkar PN, Lin XY, Heresbach-LeBerre N, *et al.* Anticipation in Crohn's disease may be influenced by gender and ethnicity of the transmitting parent. *Am J Gastroenterol* 1998; 93 (12): 2368-72.
29. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugere L, *et al.* Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996; 379 (6568): 821-3.
30. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, *et al.* A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411 (6837): 603-6.
31. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesaje S, Cezerd JP, Belaiche J, *et al.* Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411 (6837): 599-603.
32. Duerr RH, Barmada MM, Zhang L, Davis S, Preston RA, Chensny LS, *et al.* Linkage and association between inflammatory bowel disease and a locus on chromosome 12. *Am J Hum Genet* 1998; 63 (1): 95-100.
33. Cho JH, Nicolae DL, Ramos R, Fields CT, Rabenau K, Corradino S, *et al.* Linkage and linkage disequilibrium in chromosome band 1p36 in American Chaldeans with inflammatory bowel disease. *Hum Mol Genet* 2000; 9 (9): 1425-32.
34. Qiu BS, Vallance BA, Blennerhassett PA, Collins SM. The role of CD4+ lymphocytes in the susceptibility of mice to stress-induced reactivation of experimental colitis. *Nat Med* 1999; 5 (10): 1178-82.
35. Hollander D. Crohn's disease, TNF- $\alpha$ , and the leaky gut. The chicken or the egg? *Am J Gastroenterol* 2002; 97 (8): 1867-8.
36. Sands BE. Therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2000; 118 (2 supp 1): S68-S82.
37. Malchow H, Ewe K, Brandes JW, Goebell H, Ehms H, Sommer H, *et al.* European Cooperative Crohn's disease study (ECCDS): results of drug treatment. *Gastroenterology* 1984; 86 (2): 249-66.

38. Messori A, Brignola C, Trallori G, Rampazzo R, Bardazzi G, Belloti C *et al.* Effectiveness of 5-aminosalicylic acid for maintaining remission inpatients with Crohn's disease: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 1994; 89 (5): 692-698.
39. Steinhart AH, Hemphill D, Greenberg GR. Sulfasalazine and mesalazine for the maintenance therapy of Crohn's disease: A meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 1994; 89 (12): 2116-2124.
40. De Francis R, Omodei P, Ranzi T, Brignola C, Rocca R, Prada A, *et al.* Controlled trial of oral 5-aminosalicylic acid for the prevention of early relapse in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1997; 11 (5): 845-52.
41. Bebb JR, Scott BB. Systematic review: how effective are the usual treatments for Crohn's disease? *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 151-9.
42. Bouhnik Y, Lemann M, Mary JY, Scemama G, Tai R, Matuchansky EC, *et al.* Long-term follow-up of patients with Crohn's disease treated with azathioprine or 6-mercaptopurine. *Lancet* 1996; 347 (8996): 215-9.
43. Rutgeerts P, Hiele M, Geboes K, Peeters M, Penninckx F, Aerts R, *et al.* Controlled trial of metronidazole treatment for prevention of Crohn's recurrence after ileal resection. *Gastroenterology* 1995; 108 (6): 1617-21.
44. Tangan SR, Hanauer SB, van Deventer SJH, Mayer L, Present DH, Braakman T, *et al.* A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor  $\alpha$  for Crohn's disease. *N Engl J Med* 1997; 337 (15): 1029-1035.
45. Feagan BG. Maintenance therapy for inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2003; 98 (12 suppl 1): S6-S17.
46. Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, *et al.* Maintenance infliximab for Crohn's disease: the Accent I randomized trial. *Lancet* 2002; 359 (9317): 1541-9.
47. Rutgeerts P, Ghoo Y, Van Trappen E, Eyssen H. Ileal dysfunction and bacterial overgrowth in patients with Crohn's disease. *Eur J Clin Invest* 1981; 11 (3): 199-206.
48. Bengmark S. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut* 1998; 42 (1): 2-7.
49. Spirt MJ. Antibiotics in inflammatory bowel disease: new choices for an old disease. *Am J Gastroenterol* 1994; 89 (7): 974-8.
50. Chiodini RJ. Antimicrobial agents and Crohn's disease: Do they have a therapeutic role? *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1998; 30 (6): 593-8.
51. Bjarnason I, MacPherson AJ, Hollander D. Intestinal permeability: an overview. *Gastroenterology* 1995; 108 (5): 1566-81.
52. Travis S, Menzies I. Intestinal permeability: functional assessment and significance. *Clin Sci* 1992; 82 (5): 471-88.

53. Bjarnason I, Hayllar J, MacPherson AJ, Russell AS. Side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the small and large intestine in humans. *Gastroenterology* 1993; 104 (6): 1832-47.
54. Sarker SA, Gyr K. Non-immunologic defense mechanisms of the gut. *Gut* 1992; 33 (7): 987-93.
55. Bennis CL, Martin-Power E, Ganz T. Defensins and innate host defense of the gastrointestinal tract. *Gut* 1999; 45 (6): 911-5.
56. Ouellette AJ. Paneth cells and innate immunity in the crypt microenvironment. *Gastroenterology* 1997; 113 (5): 1779-84.
57. Farquhar MG, Palade GE. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* 1963; 17: 375-412.
58. Ussing HH, Windhager EE. Nature of shunt patch and active sodium transport patch through frog skin epithelium. *Acta Physiol Scand* 1964; 61: 484-504.
59. Fordtran JS, Rector FC, Ewton MF, Soter N, Kinney J. Permeability characteristics of the human small intestine. *J Clin Invest* 1965; 44: 1935-44.
60. Lindeman B, Solomon AK. Permeability of luminal surfaces of intestinal mucosal cells. *J Gen Physiol* 1962; 45: 801-10.
61. Davis G, Santa Ana C, Morawski S, Fordtran J. Permeability characteristics of human jejunum, ileum, proximal colon and distal colon: results of potential difference measurements and unidirectional fluxes. *Gastroenterology* 1982; 83 (4): 844-50.
62. Pappenheimer JR, Renkin EM, Borrero LM. Filtration, diffusion and molecular sieving through capillary membranes. A contribution to the pore theory of capillary permeability. *Am J Physiol* 1951; 167: 13-46.
63. Kotani J, Usami M, Nomura H, Iso A, Kasahara H, Kuroda Y *et al*. Enteral nutrition prevents bacterial translocation but does not improve survival during acute pancreatitis. *Arch Surg* 1999; 134 (3): 287-92.
64. Gonzalez-Mariscal L, Chavez de Ramirez B, Lazaro A, Cerejido M. Establishment of tight junctions between cells from different animal species and different sealing capacities. *J Membr Biol* 1989; 107 (1): 43-56.
65. Citi S, Sabanay H, Jakes R, Geiger B, Kendrick LL. Cingulin, a peripheral component of tight junctions. *Nature* 1988; 333 (6170): 272-6.
66. Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* 1986; 103 (3): 755-66.

67. Claude P. Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens. *J Membr Biol* 1978; 39 (2-3): 219-32.
68. Naftalin RJ, Tripathi S. Passive water flows drawn across rabbit ileum by osmotic, hydrostatic and electrical gradients. *J Physiol* 1985; 360: 27-50.
69. Madara JL. Intestinal absorptive cell tight junctions are linked to the cytoskeleton. *Am J Physiol* 1987; 253 (1 pt 1): C171-5.
70. Duffey ME, Hainau B, Ho S, Bentzel CJ. Regulation of epithelial tight junction permeability by cyclic AMP. *Nature* 1981; 294 (5840): 451-3.
71. Mullin JE, O'Brien TG. Effects of tumour promoters on LLC-PK renal epithelial tight junctions and transepithelial fluxes. *Am J Physiol* 1986; 251: C597-602.
72. Palant CE, Duffy ME, Mookerjee BK, Mo S, Bentzel CJ.  $Ca^{++}$  regulation of tight junction permeability and structure in *Nectus* gallbladder. *Am J Physiol* 1983; 245: C203-12.
73. Verkman AS. Mechanisms and regulation of water permeability in renal epithelia. *Am J Physiol* 1989; 257 (5 pt 1): C837-50.
74. Maxton DG, Catt SD, Menzies IS. Combined assessment of intestinal disaccharidases in congenital asucrasia by differential urinary disaccharide excretion. *J Clin Pathol* 1990; 43 (5): 406-9.
75. Hollander D. Cohn's disease- a permeability disorder of tight junctions? *Gut* 1988; 29 (12): 1621-4.
76. Hollander D, Koyama S, Dadufalsa V et al. Polyethylene glycol 900 permeability of rat intestinal and colonic segments in vivo and brush border membrane vesicles in vitro. *J Lab Clin Med* 1989; 113 (4): 505-15.
77. Ma TY, Hollander D, Krugliak P, Katz K. PEG 400, a hydrophilic molecular probe for measuring intestinal permeability. *Gastroenterology* 1990; 98 (1): 39-46.
78. Hollander D. The intestinal permeability barrier. A hypothesis as to its regulation and involvement in Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27 (9): 721-6.
79. Marcial MA, Carlson SL, Madara JL. Partitioning of paracellular conductance along the ileal crypt-villus axis: a hypothesis based on structural analysis with detailed consideration of tight junction structure function relationship. *J Membr Biol* 1984; 80 (1): 59-70.
80. Dawson DJ, Loble RW, Burrows PC, Nortman JA, Mahon M, Holmes R. Changes in jejunal permeability and passive permeation of sugars in intestinal biopsies in celiac disease and Crohn's disease. *Clin Sci* 1988; 74 (7): 427-31.
81. Juby LD, Rothwell J, Axon ATR. Lactulose/Mannitol test: an ideal screen for celiac disease. *Gastroenterology* 1989; 96 (1): 79-85.

82. Juby LD, Rothwell J, Axon ATR. Cellobiose/mannitol sugar test – a sensitive tubeless test for celiac disease: results in 1010 unselected patients. *Gut* 1989; 30 (4): 476- 80.
83. Menzies IS, Laker MF, Pounder RE, Bull J, Heyer S, Wheeler PG. Abnormal intestinal permeability to sugars in villous atrophy. *Lancet* 1979; 2 (8152): 1107-9.
84. Laker MF. Estimation of disaccharidases and urine by gas liquid chromatography. *J. Chromatogr* 1979; 163 (1): 9-18.
85. Behrens R, Docherty H, Elia M, Neale G. A simple enzymatic assay for urinary lactulose. *Clin Chem Acta* 1983; 137 (3): 361-7.
86. Vilela EG, Ferrari MLA, Torres HOG, Cunha AS. Permeability intestinal test with lactulose/mannitol in health volunteers by high performance liquid chromatograph. In press.
87. Casellas F, Aguade S, Soriano B, Accarino A, Molero J, Guarner L. Intestinal permeability to <sup>99m</sup>Tc-diethylenetriaminopentacetic acid in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1986; 81 (9): 767-70.
88. Delahunty T, Hollander D. A new liquid-chromatographic method for measuring polyethylene glycol in urine. *Clin Chem* 1986; 32 (2): 351-3.
89. Vilela EG, Ferrari MLA, Torres HOG, Cunha AS. Permeability intestinal test and antigliadin antibody in following of adult patients with celiac disease. In press.
90. Lifsch CH, Shulm RJ. Intestinal permeability tests: are they clinically useful? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1990; 10 (3): 283-7.
91. Secondulfo M, Iafusco D, Canatu R, deMagistris, Sapone A, Generoso M, *et al.* Ultrastructural mucosal alterations and increased intestinal permeability in non-celiac, type I diabetic patients. *Dig Liver Dis* 2004; 36 (1): 35-45.
92. Rosenfeldt V, Benefeldt E, Valerius NH, Paerregaard A, Michaelsen KF. Effect of probiotics on gastrointestinal symptoms and small intestinal permeability in children with atopic dermatitis. *J Pediatr* 2004; 145 (5): 612-6.
93. Bjarnason I, Peters TJ, Veall N. A persistent defect in intestinal permeability in coeliac disease demonstrated by <sup>51</sup>Cr-EDTA absorption test. *Lancet* 1983; 1 (8320): 323-5.
94. Johnston SD, Smye M, Watson RP. Intestinal permeability tests in coeliac disease. *Clin Lab* 2001; 47 (3-4): 143-50.
95. Falth-Magnusson K, Kjellman NI, Magnusson KE. Antibodies IgG, IgA, and IgM to food antigens during the first 18 months of life in relation to feeding and development of atopic disease. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 81 (4): 743-9.

96. Wang X, Andersson R, Soltesz V, Leveau P, Ishe I. Gut origin sepsis, macrophage function, and oxygen extraction associated with acute pancreatitis in the rat. *World J Surg* 1996; 20 (3): 299-307.
97. Meddings J. Barrier dysfunction and Crohn's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 915: 333-8.
98. Hollander D, Vadhein CM, Brettholz E, Petersen GM, Delahunty I, Rotter JJ. Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. *Ann Int Med* 1986; 105 (6): 883-5.
99. May GR, Sutherland LR, Meddings JB. Is small intestinal permeability really increased in relatives of patients with Crohn's disease? *Gastroenterology* 1993; 104 (6): 1627-32.
100. Peeters M, Geypens B, Claus D, Nevens H, Ghooos Y, Verbek G, et al. Clustering of increased small intestinal permeability in families with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1997; 113 (3): 802-7.
101. Teahon K, Smethurst P, Pearson M, Levi AJ, Bjarnasson I. The effect of elemental diet on intestinal permeability and inflammation in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1991; 101 (1): 84-9.
102. Breslin NP, Nash C, Hilsden RJ, Hershfield NB, Price LM, Meddings JB, et al. Intestinal permeability is increased in a proportion of spouses of patients with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2001; 96 (10): 2934-8.
103. Yacyshyn BR, Meddings JB. CD45RO expression on circulating CD19<sup>+</sup> B cells in Crohn's disease correlates with intestinal permeability. *Gastroenterology* 1995; 108 (1): 132-7.
104. Hilsden RJ, Meddings JB, Sutherland LR. Intestinal permeability changes in response to acetylsalicylic acid in relatives of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1996; 110 (5): 1395-403.
105. Murphy MS, Easthan EJ, Nelson R, Pearson AD, Laker MF. Intestinal permeability in Crohn's disease. *Arch Dis Chil* 1989; 64 (3):321-5.
106. Welcker K, Martin A, Kolle P, Siebeck M, Gross M. Increased intestinal permeability in patients with inflammatory bowel disease. *Eur J Med Res* 2004; 9 (10): 456-60.
107. Wyatt J, Volgelsang H, Hubl W, Waldhoer T, Lochs H. Intestinal permeability and prediction of relapse in Crohn's disease. *The Lancet* 1993; 341 (8858): 1437-9.
108. Gibson PR. Increased gut permeability in Crohn's disease: is TNF the link? *Gut* 2004; 53 (12): 1724-5.



109. Ma TY, Iwamoto GK, Hoa NT, Akotia V, Pedram A, Boivin MA, et al. TNF- $\alpha$  induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF- $\kappa$ B activation. *Am J Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286 (3): G367-76.
110. Suenart P, Bulteel V, Lemmens L, Norman M, Geypens B, van Assche G, et al. Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2002; 97 (8): 2007-11.
111. Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F Jr. Development of a Crohn's disease activity index. National cooperative Crohn's disease study. *Gastroenterology* 1976; 70 (3): 439-44.
112. Gasche C, Scholmerich J, Brnskov J, D'Haens G, Hanauer SB, Irvine EJ. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congress of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflam Bowel Dis* 2000; 6 (1): 8-15.
113. Gollop JH, Phillips SF, Melton LJ 3rd, Zinsmeister AR. Epidemiologic aspects of Crohn's disease: a population based study in Olmsted county, Minnesota, 1943-1982. *Gut* 1988; 29 (1): 49-56.
114. Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1989; 170 (supp): 2-6.
115. Loftus EV, Schoenfeld P, Sandborn WJ. The epidemiology and natural history of Crohn's disease in population-based patient cohorts from North America: a systematic review. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16 (1): 51-60.
116. Harvey RF, Bradshaw M. Measuring Crohn's disease activity. *Lancet* 1980; 1 (8178): 1134-5.
117. Van Hees PA, van Elteren PH, van Lier HJ, van Tongeren JH. An index of inflammatory activity in patients with Crohn's disease. *Gut* 1980; 21 (4): 279-86.
118. Talstad I, Gjone E. The disease activity of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Scand J Gastroenterology* 1976; 11 (4): 403-8.
119. Guyatt G, Mitchell A, Irvine EJ, Singer J, Williams N, Goodacre R, et al. A new measure of health status for clinical trials in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1989; 96 (3): 804-10.
120. Tibble JA, Bjarnason I. Non-invasive investigation of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2001; 7 (4): 460-5.
121. Van Oostayen JA, Wasser MNJM, Griffioen G, van Hogezaand RA, Lamers CBHW, de Roos A. Diagnosis of Crohn's ileitis and monitoring of disease activity: value of doppler ultrasound of superior mesenteric artery flow. *Am J Gastroenterol* 1998; 93 (1): 88-91.
122. Brasil. Portaria SAS/MS nº 858 de 04 de novembro de 2002. Dispões sobre a regulamentação do Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença de Crohn.

123. Sandborn WJ, Feagan BG, Hanauer SB, Lochs H, Lofberg R, Modigliani R, et al. A review of activity indices and efficacy endpoints for clinical trials of medical therapy in adults with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002; 122 (2): 512-30.
124. Dorn SD, Abad JF, Panagopoulos G, Korelitz BI. Clinical characteristics of familial versus sporadic Crohn's disease using the Vienna Classification. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10 (3): 201-6.
125. Heresbach D, Gicquel-Douabin V, Birebent B, D'halluin PN, Heresbach-Le Berre N, et al. NOD2/CARD15 gene polymorphism in Crohn's disease: a genotype-phenotype analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16 (1): 55-62.
126. Brasil. Portaria 593, de 25 de Agosto de 2000. Dispõe sobre a execução no Território Nacional do inciso IV do artigo 50 e do artigo 111 do Regimento Interno. *Diário Oficial da União*, 22 de Dezembro de 2000.
127. Riquelme AJ, Calvo MA, Gezman AM, Depix MS, Garcia P, Perez C, et al. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia after *Saccharomyces boulardii* treatment in immunocompromised patients. *J Clin Gastroenterol* 2003; 36 (1): 41-3.
128. Rijnders BJ, Van Wijngaerden E, Verwaert C, Peetermans WE. *Saccharomyces fungemia* complicating *S. boulardii* treatment in non-immunocompromised host. *Intensive Care Med* 200; 26 (6): 825.
129. Ukabam SO, Cooper BT. Small intestinal permeability to mannitol, lactulose and polyethylene glycol 400 in coeliac disease. *Dig Dis Sci* 1984; 29 (9): 809-16.
130. Maxton DG, Bjarnason I, Reynolds AP, Catt SD, Peters TJ, Menzies IS. Lactulose, <sup>51</sup>Cr-labelled ethylenediaminetetra-acetate, L-rhamnose and polyethyleneglycol 500 as probe markers for assessment *in vivo* of human intestinal permeability. *Clinical Science* 1986; 71: 71-80.
131. D'Inca R, Di Leo V, Corrao G, Martines D, D'Odorico A, Mestriner C, et al. Intestinal permeability test as a predictor of clinical in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 1999; 94 (10) 2956-60.
132. Troncon LEA, Pires CR, Kraus AO, Iazigi N. Estudo da permeabilidade intestinal pelo teste do <sup>51</sup>Cr-EDTA: utilidade clínica na detecção de alterações estruturais do epitélio do intestino delgado. *Arq Gastroenterol* 1996; 33 (2): 66-73.
133. Torres HOG. Avaliação da permeabilidade intestinal em pacientes submetidos à quimioterapia para leucemia mielóide aguda do adulto através do <sup>51</sup>Cr-EDTA. Belo Horizonte: Faculdade de Medicina da UFMG, 1997. 102p (Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Gastroenterologia).
134. Peeters M, Hiele M, Ghos Y, Huysmans V, Geboes K, Vantrappen G, et al. Test conditions greatly influence permeation of water soluble molecules through the intestinal mucosa: need for standardisation. *Gut* 1994; 35 (10): 1404-8.
135. Troncione R, Starita S, Coletta S, Mayer M, Greco L. Antigliadin antibody, D-xylose, and cellobiose/mannitol permeability tests as indicators of mucosal damage in children with celiac disease. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27: 703-6.

136. Arnott ID, Kingstone K, Ghosh S. Abnormal intestinal permeability predicts relapse in inactive Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35 (11): 1163-9.
137. Moum B, Ekbohm A, Vatn MH, Aadland E, Sauar J, Lygren I, *et al.* Clinical course during the first year after diagnosis in ulcerative colitis and Crohn's disease. Results of a large, prospective population-based study in southeastern Norway, 1990-93. *Scand J Gastroenterol* 1997; 32 (10): 1005-12.
138. Munkholm P, Langholz E, Davidsen M, Binder V. Disease activity courses in a regional cohort of Crohn's disease patients. *Scand J Gastroenterol* 1995; 30 (7): 699-706.
139. Freeman HF. Natural history and clinical behavior of Crohn's disease extending beyond two decades. *J Clin Gastroenterol* 2003; 37(3): 216-9.
140. Hilsden RJ, Meddings JB, Hardin J, Gall DG, Sutherland LR. Intestinal permeability and postheparin plasma diamine oxidase activity in the prediction of Crohn's disease relapse. *Inflam Bowel Dis* 1999; 5 (2): 85-91.
141. Jorgensen J, Ranlov PJ, Bjerrum PJ, Diemer BH, Bisgaard K, Elsborg L. Is an increased intestinal permeability a valid predictor of relapse in Crohn's disease? *Scand J Gastroenterol* 2001; 36 (5): 521-7.
142. Harper PH, Lee EC, Kettlewell MG, Bennett MK, Jewell DP. Role of the fecal stream in the maintenance of Crohn's colitis. *Gut* 1985; 26 (3): 279-84.
143. D'Haens GR, Geboes K, Peeters M, Baert F, Penninckx F, Rutgeers P. early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum. *Gastroenterology* 1998; 114 (2): 262-7.
144. Cartun RW, Van Kruiningen HJ, Pedersen CA, Bermen MM. An immunocytochemical search for infectious agents in Crohn's disease. *Mod Pathol* 1993; 6 (2): 212-9.
145. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, *et al.* Mucosa flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002; 122 (1): 44-54.
146. Sartor RB. Therapeutic Manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel disease: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterol* 2004; 126 (6): 1620-33.
147. Rath HC, Herfarth HH, Ikeda JS, Grenther WB, Hamm TEJ, Balish E, *et al.* Normal luminal bacteria, especially *Bacteroides* species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27 human beta2 microglobulin transgenic rats. *J Clin Invest* 1996; 98 (4): 945-53.
148. Sellon RK, Tonkonogy S, Shultz M, Dieleman LA, Grenther W, Balish E, *et al.* Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun* 1998; 66 (11): 5224-31.

149. Clancy R. Immunobiotics and the probiotic evolution. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003; 38: 9-12.
150. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ. Subsets of human dendritic cell precursors express different Toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 2001; 194 (6): 863-9.
151. Resta-Lenert S, Barrett KE. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut* 2003; 52 (7): 988-97.
152. Lammers KM, Helwig U, Swennen E, Rizzello F, Venturi A, Caramelli E, *et al.* Effect of probiotic strains on interleukin 8 production by HT29/19<sup>a</sup> cells. *Am J gastroenterol* 2002; 97 (5): 1182- 6.
153. Kirjavainen PV, Salminen SJ, Isolauri E. Probiotic bacteria in the management of atopic disease: underscoring the importance of viability. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003; 36 (2): 223-7.
154. Blehaut H, Massot J, Elmer GW, Levy RH. Disposition kinetics of *Saccharomyces boulardii* in man and rat. *Biopharm Drug Dispos* 1989; 10 (4): 353-64.
155. Péret Filho LA. Efeito da administração oral de diferentes doses de *Saccharomyces boulardii* a camundongos convencionais tratados com ciclofosfamida, em relação à sobrevida, perda de peso, translocação bacteriana e alterações histológicas no íleo terminal, fígado e baço. Belo Horizonte: Faculdade de Medicina da UFMG, 1996. 131p Tese. (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Gastroenterologia).
156. Penna FJ, Péret Filho LA, Calçado AC, Júnior HR, Nicolli JR. Up-to-date clinical and experimental basis for the use of probiotics. *J Pediatr* 2000; 76 (suppl. 2): S209- 17.
157. Péret Filho LA, Penna FJ, Bambirra EA, Nicoli JR. Dose effect of oral *Saccharomyces boulardii* treatments on morbidity and mortality in immunosuppressed mice. *J Med Microbiol* 1998; 47 (2): 111-6.
158. Gupta P, Andrew H, Kirschner BS, Guandalini S. Is Lactobacillus GG helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary, open-label study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 31 (4): 453-7.
159. Plein K, Hotz J. Therapeutic effects of *Saccharomyces boulardii* on mild residual symptoms in a stable phase of Crohn's disease with special respect to chronic diarrhea-a pilot study. *Z Gastroenterol* 1993; 31 (2): 129-34.
160. Guslandi M, Mezzi G, Sorghi M, Testoni PA. *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2000; 45 (7): 1462-4.
161. Malchow HA. Crohn's disease and *Escherichia coli*. A new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease? *J Clin Gastroenterol* 1997; 25 (4): 653-8.

162. Prantera C, Scribano ML, Falasco G, Andreoli A, Luzi C. Ineffectiveness of probiotics in preventing recurrence after curative resection for Crohn's disease: a randomized controlled trial with *Lactobacillus GG*. *Gut* 2002; 51 (3): 405-9.
163. Bousvaros A, Guandalini S, Baldassano RN, Botelho C, Evans J, Ferry GD, *et al.* *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11 (9) A randomized, double-blind trial of Lactobacillus GG versus placebo in addition to standard maintenance therapy for children with Crohn's disease. *Inflam Bowel Dis* 2005; 11(9): 833-9.
164. McKay DM. Intestinal inflammation and the gut microflora. *Can J Gastroenterol* 1999; 13 (6): 509-13.
165. Merger M, Croitoru K. Infections in the immunopathogenesis of chronic inflammatory bowel disease. *Semin Immunol* 1998; 10 (1): 69-78.
166. Sunaert P, Bulteel M, Lemmers L, Noman M, Geypens B, Assche G, *et al.* Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2002; 97 (8): 2000- 2004.

**10 - ANEXOS**

## ANEXO 1

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Para pacientes)

Você, \_\_\_\_\_, paciente do Hospital das Clínicas da UFMG, foi selecionado para participar de um projeto de pesquisa e tem o direito de saber sobre sua participação.

O objetivo desta pesquisa destina-se a conhecer melhor o quadro clínico e laboratorial da Doença de Crohn, avaliando a influência do *S. boulardii* (Floratil®) no tratamento de manutenção da remissão da doença em estudo e avaliar o comportamento da integridade da barreira da mucosa intestinal através do teste de permeabilidade intestinal.

Sua participação neste estudo é voluntária e gratuita. Você tem a liberdade de recusar participar do estudo, ou se aceitar a participar, retirar seu consentimento a qualquer momento. Este fato não implicará na interrupção de seu atendimento, que está assegurado. Ela constituirá em permitir que as informações sobre a sua doença contidas no seu prontuário sejam utilizadas na pesquisa. Caso você participe, será necessário colher a urina durante seis horas, após a ingestão de um suco contendo lactulose e manitol em doses subterapêuticas. Em um subgrupo de pacientes será administrado o Floratil®, e no segundo subgrupo será administrado o placebo. Como em qualquer tratamento você poderá experimentar, muito raramente, alguns desconfortos, como formação de gases intestinais e alteração do hábito intestinal. Os riscos que envolvem o seu tratamento estão relacionados à possibilidade do retorno da atividade da doença, que não estará aumentado após a utilização do *Saccharomyces boulardii* (Floratil®). Para tanto, você será acompanhado durante seu controle ambulatorial, por um período de seis meses.

Os benefícios esperados são: a diminuição das taxas de recorrência da Doença de Crohn e a melhora da integridade funcional da mucosa do intestino.

Os médicos da equipe do Ambulatório de Intestino do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG poderão ser contatados através de dos telefones 32489490 e 32489302 e são os responsáveis pelo seu tratamento. O telefone do Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais é 34994592.

Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

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 não 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 \_\_\_\_\_ do 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 e dos resultados obtidos com o tratamento.

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente

Nome do pesquisador : Eduardo Garcia Vilela

Segunda via: pesquisador

## ANEXO 2

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Para voluntários)

Você, \_\_\_\_\_, foi selecionado para participar de um projeto de pesquisa e tem o direito de saber sobre sua participação.

O objetivo desta pesquisa destina-se a conhecer melhor o quadro clínico e laboratorial da Doença de Crohn, avaliando a influência do *S. boulardii* (Floratil®) no tratamento de manutenção da remissão da doença em estudo e avaliar o comportamento da integridade da barreira da mucosa intestinal através do teste de permeabilidade intestinal.

Sua participação neste estudo é voluntária e gratuita. Você tem a liberdade de recusar participar do estudo, ou se aceitar a participar, retirar seu consentimento a qualquer momento. Caso você participe, será necessário colher a urina durante seis horas, após a ingestão de um suco contendo lactulose e manitol em doses subterapêuticas. Através desta coleta, teremos conhecimento de como se comporta a lactulose e o manitol em indivíduos normais, conhecendo assim, a integridade da mucosa em pessoas saudáveis. Os resultados obtidos serão utilizados para comparação com os resultados obtidos da urina coletada dos pacientes com doença de Crohn. Não há riscos para sua saúde durante a realização do exame.

Os médicos da equipe do Ambulatório de Intestino do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG poderão ser contatados através de dos telefones 32489490 e 32489302 e são os responsáveis pelo seu tratamento. O telefone do Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais é 34994592.

Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Eu, \_\_\_\_\_ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidado a participar. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão. Eu entendi que qualquer problema relacionado ao exame será abordado por um dos médicos da equipe, sem ônus para mim.

Eu, \_\_\_\_\_, após esclarecido sobre a pesquisa, aceito a participar do estudo, concordando com o uso, na pesquisa, das informações clínicas e laboratoriais.

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do voluntário

Nome do pesquisador : Eduardo Garcia Vilela

Segunda via: pesquisador



**ANEXO 3**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**HOSPITAL DAS CLINICAS**  
**Instituto Alfa de Gastroenterologia**

**Ambulatório de Intestino**

**PROTOCOLO DE DOENÇA DE CROHN****IDENTIFICAÇÃO**

NOME: \_\_\_\_\_ CASO No. \_\_\_\_\_

REGISTRO: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_\_

IDADE \_\_\_\_\_

SEXO: ( ) F ( ) M

COR: LEUCO ( ) FAIO ( ) MELANO ( )

PROFISSÃO: \_\_\_\_\_ ESCOLARIDADE: \_\_\_\_\_

DATA DE NASCIMENTO: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ NATURALIDADE: \_\_\_\_\_

NACIONALIDADE: \_\_\_\_\_ ASCENDÊNCIA: \_\_\_\_\_

ENDEREÇO: RUA/Av: \_\_\_\_\_

TELEFONE: \_\_\_\_\_

IDADE AO DIAGNÓSTICO: \_\_\_\_\_

IDADE AO INÍCIO DOS SINTOMAS: \_\_\_\_\_

**MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS AO DIAGNÓSTICO**

Febre (> 37.5)	S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>
Emagrecimento (= _____ Kg)	S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>
Náuseas	S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>
Vômitos	S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>
Hiporexia	S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>
Úlceras orais	S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>
Disfagia	S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>
Odinofagia	S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>
Empachamento pós-prandial	S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>
Dor abdominal	S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>
. localizada FID e FD	S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>
. localizada hipogástrico	S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>
. difusa	S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>

- . tipo cólica. S  N
- . diurna S  N
- . noturna S  N
- . D + N S  N
- Diarréia (> 3 evacuações liq-past/dia) S  N
- Especificar \_\_\_\_\_
- Tenesmo S  N
- Constipação (mais de 3 dias) S  N
- Astenia S  N
- Intolerância a leite e derivados S  N
- Infecção” urinária crônica S  N
- Massa abdominal palpável (plastrão) S  N

**OUTRAS MANIFESTAÇÕES ( SE PRESENTES, DATA DO DIAGNÓSTICO E MÉTODO DIAGNÓSTICO)**

Artrite S  N

Irite S  N

Uveíte S  N

Ceratoconjuntivite S  N

Eritema Nodoso S  N

Espondilite Anquilosante S  N

Pericolangite e/ou Colangite esclerosante S  N

Amiloidose S  N

Pioderma gangrenoso S  N

Colelitíase S  N

Nefrolitíase S  N

Sacroileíte S  N

Obstrução ureteral S  N

**COMPLICAÇÕES**

Abscesso perianal S  N

Fístula perianal S  N

cirurgia : \_\_\_\_\_

---



---

Abdome agudo (provável apendicite) S  N

---

Obstrução intestinal alta S  N

---

Obstrução intestinal baixa S  N

---

Fistula entero-cutânea S  N

---

Outras fístulas:

---



---

Abscesso intra-abdominal S  N

---

Cirurgia do TGI devido a DC. S  N

---



---

### **DOENÇAS ASSOCIADAS**

Tabagismo: S  N

Tempo/No. cigarros/ dia \_\_\_\_\_

---

Etilismo: S  N

Tempo / Quantidade / dia \_\_\_\_\_

---

Outras: \_\_\_\_\_

---



---



---



---

### **USO DE MEDICAMENTOS**

Drogas (tempo de uso, doses, presença ou não de efeitos colaterais)

---



---



---



---



---



---



---



---



---



---

### **ANTECEDENTES FAMILIARES**

Doença hepática: S  N  I   
 Doença auto-imune S  N  I   
 Doença inflamatória intestinal S  N  I   
 Espondilite anquilosante S  N  I   
 Outras: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Especificar grau de parentesco \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

### **EXAME FÍSICO**

PESO HABITUAL: \_\_\_\_\_

PESO ATUAL: \_\_\_\_\_

% PERDA DE PESO: \_\_\_\_\_

Alterações: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

### **EXAMES DE PATOLOGIA CLÍNICA**

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

Hemograma: Hm: \_\_\_\_\_, Hb: \_\_\_\_\_, Ht: \_\_\_\_\_

VCM: \_\_\_\_\_ CHCM \_\_\_\_\_

Leuc. \_\_\_\_\_ Meta: \_\_\_\_\_ B: \_\_\_\_\_ S: \_\_\_\_\_ E: \_\_\_\_\_ M: \_\_\_\_\_

B: \_\_\_\_\_ L: \_\_\_\_\_

Plaquetas: \_\_\_\_\_

VHS: \_\_\_\_\_ Proteína C Reativa: \_\_\_\_\_ Mucoproteínas: \_\_\_\_\_

Ferro sérico: \_\_\_\_\_ CTLFe: \_\_\_\_\_

Dosagem sérica de ác.fólico: \_\_\_\_\_ Vit B12: \_\_\_\_\_

TGO: \_\_\_\_\_ TGP: \_\_\_\_\_ GGT: \_\_\_\_\_

Bilirrubina T: \_\_\_\_\_ BD: \_\_\_\_\_ BI: \_\_\_\_\_

Fosfatase alc.: \_\_\_\_\_

Proteínas Totais: \_\_\_\_\_ Albumina: \_\_\_\_\_ Globulinas: \_\_\_\_\_

Atividade da prot.: \_\_\_\_\_

Glicemia de jejum: \_\_\_\_\_

Uréia: \_\_\_\_\_ Creatinina: \_\_\_\_\_

Sódio: \_\_\_\_\_ Potássio: \_\_\_\_\_ Cloretos: \_\_\_\_\_ Calcio: \_\_\_\_\_ Magnésio: \_\_\_\_\_

Alfa-1-Anti-Tripsina sérica: \_\_\_\_\_

Eletroforese de proteínas séricas:

Albumina: \_\_\_\_\_ Alfa-1-globulina: \_\_\_\_\_ Alfa-2-globulina: \_\_\_\_\_

Beta-1-globulina: \_\_\_\_\_ Beta-2-globulina: \_\_\_\_\_ Gama-globulina \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Sumário de urina:

Densidade: \_\_\_\_\_ pH: \_\_\_\_\_  
 Piócitos: \_\_\_\_\_ Hemácias: \_\_\_\_\_ Cilíndros: \_\_\_\_\_ Cristais: \_\_\_\_\_

Proteína: \_\_\_\_\_ Hemoglobina: \_\_\_\_\_ R. Nitrito: \_\_\_\_\_

Exame parasitológico de fezes: Primeira amostra: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Segunda amostra: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Terceira amostra: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Alfa-1-Antitripsina fecal \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Volume fecal: \_\_\_\_\_ Peso fecal: \_\_\_\_\_

Concentração fecal: \_\_\_\_\_ Concentração sérica: \_\_\_\_\_

Clearance: \_\_\_\_\_

EDTA

Lote: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Data de diluição do padrão: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Volume da diluição do padrão: \_\_\_\_\_

Data da ingestão: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Data da contagem: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Dose ingerida: \_\_\_\_\_

Volume urinário da 24hs: \_\_\_\_\_

Contagens na urina: \_\_\_\_\_

Contagens de padrão: \_\_\_\_\_

## **MÉTODOS DE IMAGEM**

### ESTUDO CONTRASTADO DOS INTESTINOS DELGADO E GROSSO

Espessamento de pregas mucosas S  N

Espessamento da parede das alças S  N

Distorção de pregas mucosas S  N

Imagem de depósito de contraste S  N

Imagens espiculares em parede da alça S  N

“Cobblestones” S  N

Imagem de “tubo rígido” S  N

Áreas de estenoses S  N

“Sinal de Corda” (ou) “Sinal de Cordel” S  N

“Lesões em salto” (lesões estenóticas em mais  
de 1 segmento intestinal) S  N

Dilatação de alças S  N

Trajeto fistulosos: entero- entérico S  N

entero-vesical S  N   
 entero-uterino. S  N   
 outros/cítar \_\_\_\_\_  
 Nodosidades ou falhas de enchimento nodulares S  N   
 Sinal da janela S  N   
 Especificar o local das alterações observadas acima \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

US ABDOMINAL: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

TC ABDOMINAL: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

### **MÉTODOS ENDOSCÓPIOS**

Retossigmoidoscopia	EDA	Colonoscopia	
Edema e enantema da mucosa		S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>	S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>			S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>
Friabilidade e/ou sangramento-	S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>	S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>	S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>
Úlceras aftóides	S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>	S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>	S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>
Úlceras lineares e/ou serpiginosas	S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>	S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>	S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>
“Cobblestone”	S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>	S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>	S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>
Trajetos fistulosos	S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>	S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>	S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>
Estenoses.	S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>	S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>	S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>
Lesões da papila íleo-cecal		S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>	
Outras alterações _____			

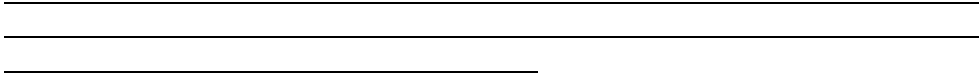
### **ESTUDO HISTÓLOGICO**

Sítio \_\_\_\_\_ da  
 lesão: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Infiltrado inflamatório polimorfo e mononuclear transmural. S  N   
 Folículos linfóides submucosos S  N   
 Histiócitos epitelióides S  N   
 Células gigantes tipo S  N   
 Organização de granulomas não caseosos S  N









**ANEXO 5**

**DADOS OBTIDOS ATRAVÉS DO PREENCHIMENTO DOS  
PROTOCOLOS**

