



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

ANA PAULA FERNANDES DA SILVA

**AVALIAÇÃO IMUNOQUIMILUMINESCENTE E IMUNOISTOQUÍMICA
DA CALPROTECTINA EM DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS**

Recife
2017

ANA PAULA FERNANDES DA SILVA

**AVALIAÇÃO IMUNOQUIMILUMINESCENTE E IMUNOISTOQUÍMICA
DA CALPROTECTINA EM DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como pré requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientador:

Prof. Dr. Mario Ribeiro de Melo Júnior

Departamento de Patologia, CCS/UFPE;

Laboratório de Immunopatologia Keizo Asami – LIKA.

Recife

2017

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S586a Silva, Ana Paula Fernandes da.
Avaliação imunoquimiluminescente e imunoistoquímica da calprotectina em doenças inflamatórias intestinais / Ana Paula Fernandes da Silva. – 2017.
82 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Mário Ribeiro de Melo Júnior.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia. Recife, 2017.
Inclui referências e anexos.

1. Doença de Crohn. 2. Proctocolite. 3. Medições luminescentes. 4. Imunoistoquímica. I. Melo Júnior, Mário Ribeiro de (Orientador). II. Título.

616.07 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2017-071)

ANA PAULA FERNANDES DA SILVA

Avaliação imunoquimiluminescente e imunoistoquímica da calprotectina em doenças inflamatórias intestinais. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Patologia. Universidade Federal de Pernambuco.

Dissertação aprovada em: 23/01/2017

Banca Examinadora:

Examinador Interno: **Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves Lima Neto**

Departamento de Medicina Tropical, CCS-UFPE

Assinatura:_____

Examinador Externo: **Prof. Dr. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira**

Departamento de Histologia e Embriologia, CCB-UFPE

Assinatura:_____

Examinador Externo: **Prof. Dr. Maurílio Toscano de Lucena**

Hospital Barão de Lucena

Centro Universitário Maurício de Nassau, Uninassau

Assinatura:_____

Recife

2017

Ao meu avô, **Evandro Fernandes**, *in memoriam*,
pela sua dedicação e por ser minha pessoa preferida no mundo.

AGRADECIMENTOS

A minha família que me fez chegar até aqui e por me fazer ser quem sou, muito obrigada.

Ao meu orientador, o Prof. Mario Ribeiro, pela orientação, disponibilidade e incentivo conferido nesses últimos anos. Obrigada por acreditar em mim. Serei eternamente grata ao Lulu por ter nos apresentado.

A minha prima e querida amiga, Renata Gabrielle, por tudo.

A Deise Gonçalves (Deisoca), Regirleide Silva (Leda) e Pamela Karinne (Sis) por me apoiar em mais uma aventura acadêmica.

Aos amigos Alyne Arruda, Jones Johnson, Larissa Ximenes, Paulo Fernandes, Remo Oliveira e Vanik Lima. Obrigada por todo amor, dedicação e cafés.

Ao Gabriel Mazzaferro, por fazer parte do meu dia a dia mesmo a quilômetros de distância e pela trilha sonora (de hoje e de sempre).

A Gabriela Ayres e Luiza Lima, pela amizade e todo suporte experimental.

Aos meus amigos de pesquisa Luciano Mello, Keilla Paz, Tiago Arruda e Ingrid Tavares por dividirem comigo essa jornada.

A todos os amigos e professores do mestrado em Patologia, que contribuíram para minha formação pessoal e profissional.

Ao Programa de Pós-graduação em Patologia da UFPE, em especial a Margarete Valdevino, pela dedicação e suporte acadêmico nestes dois anos.

Ao CNPq e a CAPES, pelo apoio financeiro dado ao projeto e bolsa, sem os quais esta pesquisa não poderia ter sido desenvolvida.

Apri la mente a quel ch'io ti paleso e
fermalvi entro, ché non fa scienza,
sanza lo ritenere, avere inteso.

Dante Alighieri

La Divina Commedia. Paradiso, Canto V.

RESUMO

A mucosa intestinal inflamada contém um grande número de neutrófilos e proteínas derivadas dessas células, como a alfa-1-antitripsina, elastase, calprotectina e lactoferrina. A calprotectina representa 60% da proteína do citosol de neutrófilos e desempenha funções imunorreguladoras e antimicrobianas. Por se tratar de uma proteína amplamente expressa em neutrófilos, esta se relaciona muito bem com a análise histopatológica, pois reflete as condições de migração leucocitária, possibilitando consequentemente a avaliação do grau e o tipo de inflamação estabelecida. Altos níveis de calprotectina em pacientes com doença inflamatória intestinal são resultantes do aumento da infiltração de neutrófilos na mucosa intestinal e a transmigração para o lúmen intestinal. No presente trabalho o anticorpo anti-calprotectina foi submetido a conjugação com éster de acridina para detecção imunoquimiluminescente, imunoistoquímica indireta e histomorfometria para avaliação da imunorreatividade da atividade inflamatória em tecidos anorretais de pacientes com doença de Crohn (n = 9) ou retocolite ulcerativa (n = 30). As características histopatológicas das amostras foram descritas através da aplicação das técnicas histoquímicas de hematoxilina e eosina, tricrômico de Masson, ácido periódico de Shiff e azul de alcian. O perfil epidemiológico dos pacientes foi estabelecido através de aplicação de questionário sociodemográfico. No estudo imunoquimiluminescente os valores de calprotectina foram de 112846 a 590203 ULR para DC e de 101235 a 658948 ULR para RCU. A calprotectina esteve significativamente aumentada nos tecidos lesionados quando comparados aos controles ($p < 0,05$) tanto no ensaio quimiluminescente quanto no imunoistoquímico. Os resultados quantitativos deste estudo sustentam a hipótese de que o aumento da calprotectina seja resultado da migração de neutrófilos da mucosa inflamada para o lúmen intestinal.

Palavras chave: Doença de Crohn. Proctocolite. Medições luminescentes. Imunoistoquímica.

ABSTRACT

The inflamed intestinal mucosa contains a large number of neutrophils and cell-derived proteins, such as alpha-1-antitrypsin, elastase, calprotectin and lactoferrin. Calprotectin represents 60% of the neutrophil cytosol protein content and plays immunoregulatory and antimicrobial functions. On account of being a protein widely expressed in neutrophils, this is very well related to a histopathological analysis, because it reflects as conditions of leukocyte migration, thus allowing an evaluation of the degree and type of inflammation established. High levels of calprotectin in patients with inflammatory bowel disease are results of increased neutrophil infiltration into the intestinal mucosa and a transmigration into the lumen gut. In present study, the anti-calprotectin antibody was subjected to conjugation with acridine ester for immunochemiluminescent detection, indirect immunohistochemistry and histomorphometry study to evaluate the immunoreactivity of inflammatory activity in anorectal tissues of patients with Crohn's disease (n = 9) or ulcerative colitis (n = 30). The histopathological characteristics of the samples were described by histochemical techniques of hematoxylin and eosin, Masson's trichrome, periodic acid of Schiff and alcian blue. The epidemiological profile of the patients was established using the sociodemographic questionnaire. In the immunochemiluminescent study the values of calprotectin were 112846 to 590203 RLU for DC and 101235 to 658948 RLU for RCU. Calprotectin was significantly increased in the injured tissues when compared to controls ($p < 0.05$) in both the chemiluminescent and immunohistochemical assays. The quantitative results of this study support the hypothesis that the increase of calprotectin resulted from the migration of neutrophils from the inflamed mucosa to the intestinal lumen.

Keywords: Crohn's disease. Proctocolitis. Luminescent measurements. Immunohistochemistry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Desenho esquemático do sistema digestivo.....	15
Figura 2	Desenho esquemático da estrutura histológica do trato gastrointestinal	16
Figura 3	Quadro conceitual da patogênese das DII.....	17
Figura 4	Prevalência global de DII em 2015.....	18
Figura 5	Internações por DII em regiões brasileiras no período de janeiro de 2008 a outubro de 2016.....	19
Figura 6	Localização anatômica das lesões na doença de Crohn.....	20
Figura 7	Aspectos histopatológicos gerais da doença de Crohn.....	21
Figura 8	Manifestações extraintestinais na doença de Crohn.....	22
Figura 9	Localização anatômica das lesões na retocolite ulcerativa.....	23
Figura 10	Aspectos histopatológicos gerais da retocolite ulcerativa.....	24
Figura 11	Estrutura molecular da calprotectina.....	27
Figura 12	Esquema de reação quimiluminescente dos ésteres derivados de acridina.....	30
Figura 13	Esquema de ensaio imunoquimiluminescente com éster de acridina.....	31
Figura 14	Esquema da reação imunoistoquímica indireta	32
Figura 1 (Artigo I)	Fluxograma da seleção dos artigos para inclusão na revisão sistemática.....	43
Figure 1 (Short communication)	Alterations observed in Crohn's disease (100x, HE, MT, AB/PAS)	52
Figure 2 (Short communication)	Alterations observed in Ulcerative colitis (100x, HE, MT, AB/PAS)	53
Figura 1 (Artigo II)	Perfil cromatográfico do conjugado (AntiCalprotectina-AE).....	60
Figura 2 (Artigo II)	Comparação entre a imunoquimiluminescência da DC, RCU e controle.....	61
Figura 3 (Artigo II)	Expressão tecidual da calprotectina no citoplasma de neutrófilos em paciente com doença de Crohn.....	62
Figura 4 (Artigo II)	Percentual de quantificação da imunorreatividade (em pixel) da calprotectina por campo captado.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 (Artigo I)	Características dos estudos com associação entre biomarcadores fecais e doenças inflamatórias intestinais, 2011/2015.....	45
Tabela 2 (Artigo I)	Principais resultados em ordem cronológica dos estudos com associação entre biomarcadores fecais e doenças inflamatórias intestinais, 2011/2015.....	46-47
Tabela 1 (Artigo II)	Dados morfométricos da imunorreatividade da calprotectina....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB - Alcian blue

CDAI - *Crohn's Disease Activity Index*

DAMP - *Damage Associated Molecular Pattern*

DC - Doença de Crohn

DII - Doenças inflamatórias intestinais

EA - Éster de acridina

EGF - *Epidermal Growth Factor*

EROS - Espécies reativas de oxigênio

HE - Hematoxilina e eosina

HOMO - *Highest occupied molecular orbitals*

IL - Interleucinas

LUMO - *Lowest unoccupied molecular orbitals*

NK - Células *natural killer*

NOD2 - *Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2*

PAS - *Periodic acid–Schiff*

PBS - Tampão fosfato sódico

PCR - Proteína C reativa

QL - Quimiluminescência

RCU - Retocolite ulcerativa

TGI - Trato gastrintestinal

Th17 - Linfócitos T auxiliar 17

Th2 - Linfócitos T auxiliar 2

TLR - *Toll-like receptors*

TM - Tricrômico de Masson

TNF- α - *Tumor Necrosis Fator alpha*

UCAI - *Ulcerative Colitis Activity Index*

ULR - Unidade de luz relativa

VHS - Velocidade de hemossedimentação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1 Considerações sobre o Trato Gastrointestinal.....	15
2.2 Doenças Inflamatórias Intestinais.....	16
2.3 Doença de Crohn.....	20
2.4 Retocolite Ulcerativa.....	23
2.5 Biomoléculas Relacionadas as DII.....	26
2.6 Calprotectina.....	27
2.7 Ensaio Quimiluminescente.....	28
2.8 Imunoistoquímica.....	31
3. JUSTIFICATIVA.....	33
4. OBJETIVOS.....	34
4.1 Objetivo Geral.....	34
4.2 Objetivos Específicos.....	34
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
5.1 Amostras.....	35
5.2 Aspectos Éticos.....	35
5.3 Aspectos Epidemiológicos.....	35
5.4 Estudo Histopatológico.....	36
5.5 Estudo Imunoquimiluminescente.....	36
5.6 Estudo Imunoistoquímico.....	37
5.7 Análise Histomorfométrica Digital.....	38
5.8 Análise Estatística.....	38
6. RESULTADOS.....	39
6.1 Artigo 1.....	39
6.2 Short communication.....	51
6.3 Artigo 2.....	55
7. CONCLUSÕES.....	67
REFERÊNCIAS.....	68
ANEXOS.....	75

1. INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias intestinais (DII) que incluem a doença de Crohn (DC) e retocolite ulcerativa (RCU) são descritas como condições crônicas de etiologia multifatorial marcadas por episódios recorrentes de inflamação do trato gastrointestinal (Sachar & Walfish, 2013).

Informações epidemiológicas precisas sobre os coeficientes de incidência e prevalência das DII são dificultadas por se tratar de um grupo heterogêneo de doenças, de classificação complexa e com critérios diagnósticos que não são universalmente padronizados (Molodecky et al., 2012). Apesar das limitações metodológicas, observa-se na literatura dados epidemiológicos consistentes e reprodutíveis em diferentes áreas geográficas e etnias (Cosnes et al., 2011).

Embora haja divergências no que diz respeito à incidência, sítio anatômico de envolvimento, apresentação clínica, evolução e resposta terapêutica, os subtipos DC e RCU compartilham os mesmos aspectos etiológicos (Hart & Ng, 2015; Ho, Boyapati & Satsangi, 2015). A incidência em ascensão, principalmente em países industrializados ocidentais, indicam que o surgimento das DII está relacionado à redução da frequência de infecções entéricas, devido a melhorias nas condições de higiene e armazenamento de alimentos (Kanai et al., 2014).

Modelos experimentais e estudos clínicos propõem que este surgimento é decorrente da ação conjunta de fatores ambientais, imunológicos, microbiológicos e genéticos, que resultam em alterações na integridade da barreira mucosa intraluminal intestinal (Peña, 2006). O fluxo transepitelial de bactérias entéricas promove ativação da imunidade inata desencadeando o processo patológico (McGovern et al., 2005; Palmela, Torres & Cravo, 2015).

Os sintomas dos pacientes podem ser indicadores de inflamação e atividade da doença, mas são subjetivos e, muitas vezes, influenciados por outros fatores não inflamatórios da doença, como a fibrose. A combinação dos sinais e sintomas dos pacientes com DII é utilizada em vários índices clínicos que foram criados para calcular a atividade inflamatória *Crohn's Disease Activity Index* (CDAI) para DC e *Ulcerative Colitis Activity Index* (UCAI) para RCU (Beaugerie et al., 2006; Walsh et al., 2014).

Na ausência de um sintoma patognomônico para o diagnóstico da DC que possibilite a diferenciação com a RCU, outras formas de enterocolites e a síndrome

do intestino irritável, o diagnóstico diferencial é baseado na avaliação conjunta de dados clínicos, histórico do paciente, localização e extensão das lesões, exames contrastados de trânsito intestinal e análises laboratoriais, radiológicas, endoscópicas e histológicas (Kucharzik et al., 2006, Maconi et al., 2014).

Sendo assim, tem sido cada vez mais crescente o interesse por métodos de diagnósticos que ofereçam técnicas com maior sensibilidade e especificidade, que possibilitem a quantificação da gravidade e da extensão das lesões. Neste contexto, destacam-se a imunoistoquímica de biópsias teciduais e diferentes tipos de imunoensaios enzimáticos ou quimiluminescentes (Roda, Seidel & Niessner, 2011).

A mucosa intestinal inflamada contém um grande número de neutrófilos e proteínas derivadas dessas células, como a alfa-1-antitripsina, elastase, calprotectina e lactoferrina. A calprotectina representa 60% da proteína do citosol de neutrófilos e desempenha funções imunorreguladoras e antimicrobianas (Gisbert & McNicholl, 2009). Por refletir as condições de infiltração leucocitária na mucosa intestinal e participar ativamente da patogênese das DII, a calprotectina se torna um marcador ideal para avaliação do processo inflamatório na DC e na RCU (Roszak et al., 2015).

Os ensaios imunoquimiluminescentes apresentam uma elevada sensibilidade (superior aos ensaios espectrofotométricos e fluorimétricos) por permitirem detecção na faixa de femtomoles ou atomoles (10^{-15} a 10^{-18} mol) com grande estabilidade analítica (Ferreira & Rossi, 2002). Estes ensaios baseiam-se na detecção da emissão de luz, decorrente da reação entre o antígeno e anticorpo marcados por compostos quimiluminescentes, como o éster de acridina (Brown et al., 2009).

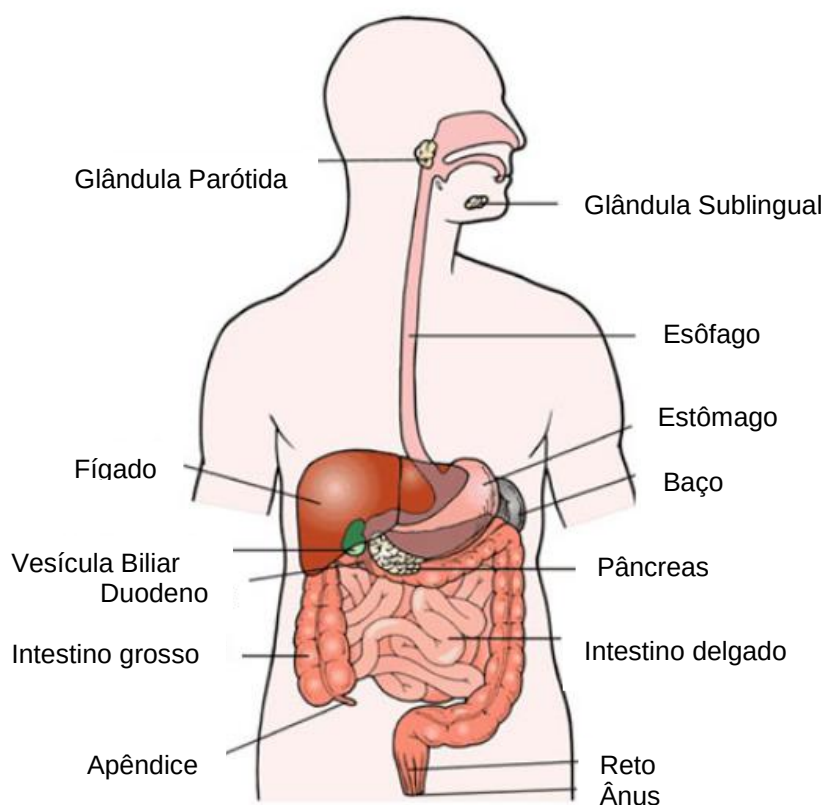
O ensaio imunoquimiluminescente para anticorpo anti-calprotectina em biópsias de pacientes diagnosticados com DC e RCU permitirá a identificação do perfil de expressão desta proteína, contribuindo para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese das DII.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Considerações sobre o Trato Gastrointestinal

O trato gastrointestinal (TGI) (Figura 1), que se estende da cavidade bucal ao ânus (canal alimentar), e os órgãos anexos (dentes, língua, glândulas salivares, fígado, vesícula biliar e pâncreas) constituem o sistema digestório. As estruturas do TGI incluem: boca, faringe, esôfago, estômago, intestino delgado, intestino grosso, reto e ânus (Coelho, 2012).

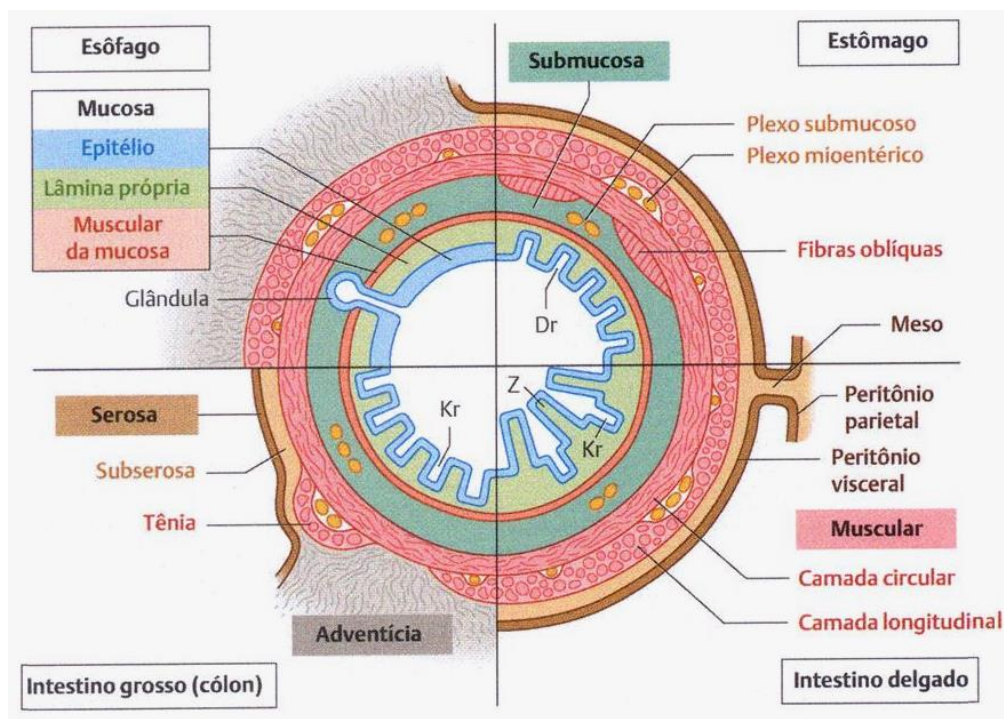
Figura 1: Desenho esquemático do sistema digestivo



Fonte: <http://www.auladeanatomia.com/digestorio/sistemadigestorio.htm>

A estrutura histológica geral do canal alimentar (Figura 2) é constituída por 4 camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa (Coelho, 2012).

Figura 2: Desenho esquemático da estrutura histológica do trato gastrointestinal



Fonte: <http://www.auladeanatomia.com/digestorio/sistemadigestorio.htm>

Tem como funções principais a transformação mecânica e química das macromoléculas ingeridas na alimentação em moléculas absorvíveis pelos capilares sanguíneos da mucosa do intestino, e eliminação dos resíduos alimentares não digeridos e não absorvidos (Coelho, 2012).

2.2 Doenças Inflamatórias Intestinais

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são definidas como processos inflamatórios crônicos, de etiopatogênese multifatorial, que acometem o TGI. Caracterizadas por episódios recorrentes de inflamação intercalados por períodos de acalmia, com ampla variedade de manifestações clínicas (Kucharzik et al., 2006).

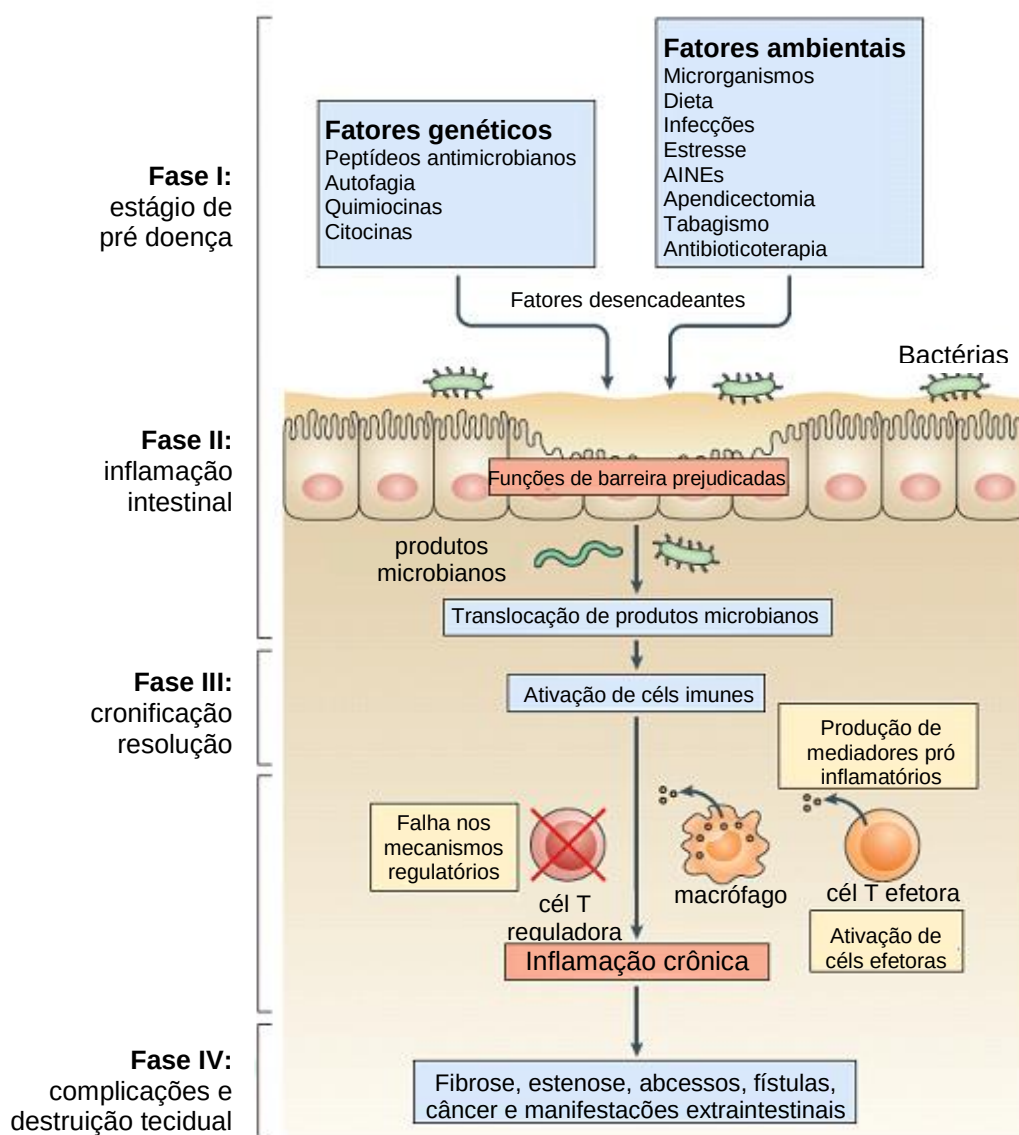
A doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa (RCU) representam as principais formas crônicas de DII. Apesar de serem doenças com sítios anatômicos distintos, a DC e RCU compartilham aspectos clínicos e epidemiológicos que sugerem a possibilidade de fatores etiopatogênicos comuns (Sartor, 2006).

O desenvolvimento das DII (Figura 3) é atribuído à ação de diversos fatores ambientais relacionados principalmente a adoção de dietas ocidentais, a melhorias nas condições de higiene e de armazenamento de alimentos que reduzem

significativamente a frequência de infecções entéricas (Kanai et al., 2014; Spooren et al., 2013, Wu et al., 2011). Tem-se que a exposição a microrganismos durante as primeiras fases da vida confere uma proteção contra o desenvolvimento de autoimunidade em fases mais tardias (Garret, Gordon & Glimcher, 2010).

O desequilíbrio da microbiota comensal entérica (Cammarota et al., 2015), a desregulação do aparato imunológico da mucosa intestinal e a suscetibilidade a mutações genéticas nos genes *nucleotide-binding oligomerization domain containing 2* (NOD2) e *toll-like receptors* (TLR) também são fatores contributivos para das DII (Geremia et al., 2014, Lakatos et al., 2006; Radford-Smith & Pandeya, 2006).

Figura 3. Quadro conceitual da patogênese das DII



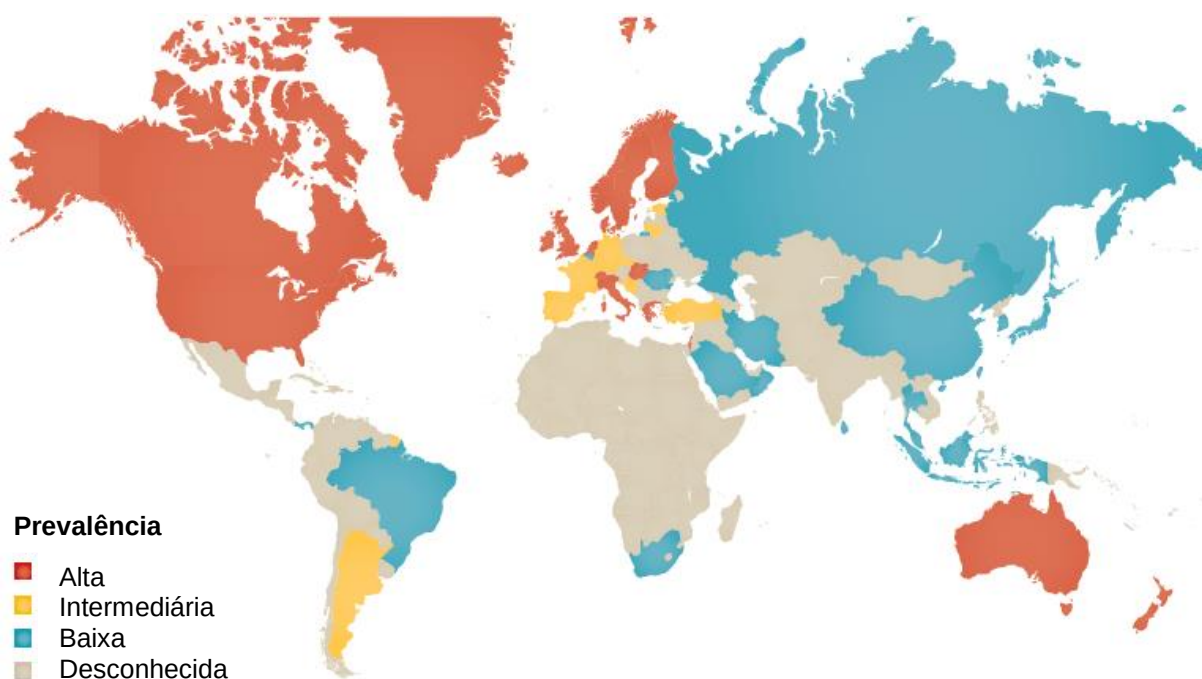
Fonte: Adaptado de Neurath, 2014

A localização anatômica e o grau de inflamação determinam os sintomas predominantes destas afecções que podem incluir dor abdominal, diarreia e sangramento retal. Frequentemente lesões em regiões como pele, olhos, articulações, pulmão, genitália, fígado, que geram variados sintomas, também são descritas nestas afecções (Szigethy, McLafferty & Goyal 2010).

As DII afetam indivíduos de diversas partes do mundo (Figura 4). As taxas de incidência variam de 3,1 a 20,2 casos novos por 100.000 habitantes por ano para a DC e 2,2 a 19,2 por 100.000 habitantes para RCU (Benchimol et al., 2014).

A prevalência é de mais de 200 casos por 100.000 habitantes no Ocidente (Cosnes et al., 2011). América do Norte, Inglaterra, Escandinávia e países da Região do Norte da Europa são classificadas como áreas com altos índices de DII, Sul da Europa, África do Sul, Austrália e Nova Zelândia são as regiões de incidência intermediária e na Ásia e América do Sul são considerados como regiões de baixa incidência (Loftus, 2004).

Figura 4: Prevalência global de DII em 2015



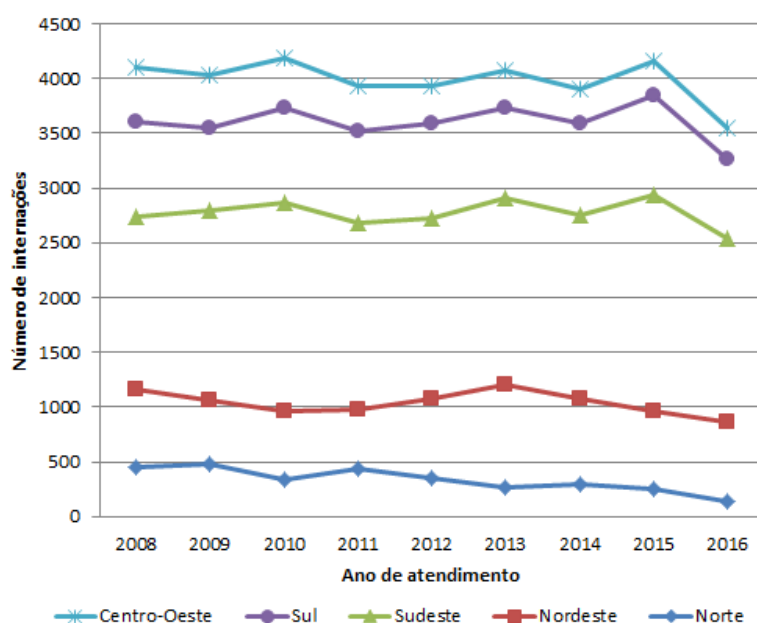
Fonte: Adaptado de Kaplan, 2015

Nos Estados Unidos, cerca de 1,4 milhões de pessoas apresentam uma das formas de DII na Europa 2,2 milhões e no Canadá cerca de 150 mil pessoas. Importantes trabalhos retrospectivos demonstraram que está havendo uma

tendência mundial para o aumento da incidência da DC no mundo, incluindo o Brasil, embora ainda não existam estudos epidemiológicos concretos (Molodecky et al., 2012; Oliveira, Emerick & Soares, 2010).

Segundo o DATASUS, no Brasil entre janeiro de 2008 e outubro de 2016 houveram 35.862 internações (Figura 5) com 941 mortes relacionadas as doenças inflamatórias intestinais. Na região nordeste, neste mesmo período, 6.293 internações foram relatadas, sendo 1.608 casos no estado de Pernambuco.

Figura 5: Internações por DII em regiões brasileiras no período de janeiro de 2008 a outubro de 2016



Fonte: Datasus

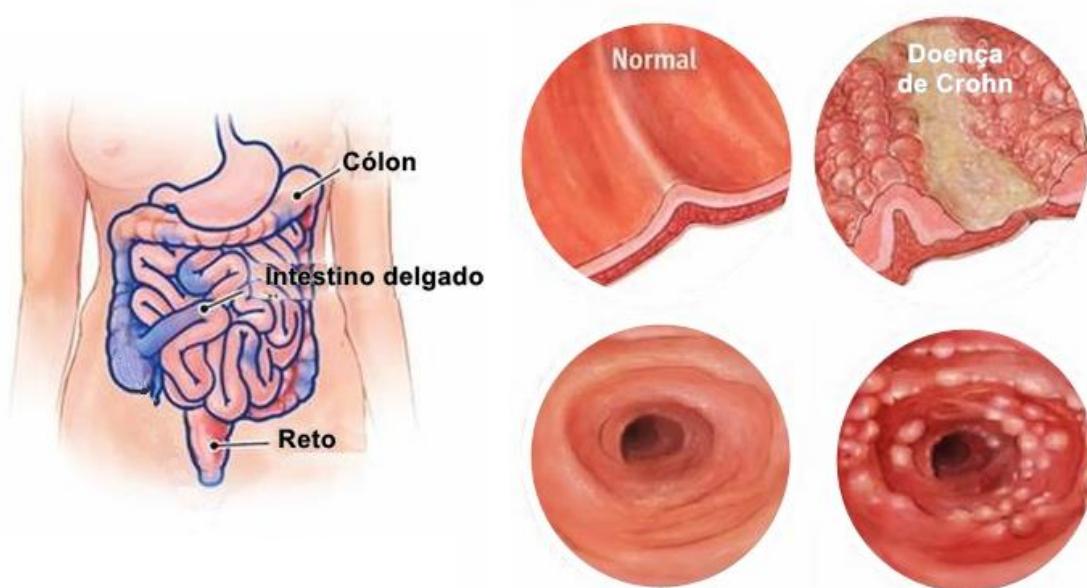
Existe uma predominância das DII em pessoas caucasianas. A faixa etária mais susceptível compreende indivíduos de vinte a quarenta anos. Não há predominância de sexo, mas uma possível associação com grupos étnicos específicos (Malhotra et al., 2014). A diferenciação entre incidência e prevalência, de acordo com a base étnica, localização urbana e rural da população, também é descrita. Estudos epidemiológicos têm consistentemente documentado maior incidência na população dos judeus *ashkenasi* do que na população não judaica. Prevalece, ainda, em moradores de áreas urbanas, pessoas de classes econômicas mais altas, fumantes e parentes de primeiro grau de indivíduos acometidos por DII (Benchimol et al., 2014; Cosnes et al., 2011).

Um outro aspecto relevante é o aumento da incidência de DII em países cujas condições socioeconômicas vêm sendo melhoradas, como, por exemplo, em países da América Latina indicando uma forte influência ambiental na patogênese das DII (Oliveira, Emerick & Soares, 2010). A DC e a RCU foram consideradas raras nos países da América do Sul, porém estudos recentes apresentaram um aumento significativo da incidência destas doenças na literatura. No meio clínico, estas doenças não são consideradas de notificação compulsória, o que nos leva a conjecturar que as DII podem não estar sendo diagnosticadas corretamente. Uma vez que os prontuários médicos registram altas taxas de diarreias de etiologia bacteriana ou parasitária (Souza, Belasco & Aguilar-Nascimento, 2008).

2.3 Doença de Crohn

A doença de Crohn (DC) constitui uma desordem descontínua e transmural, que pode acometer qualquer porção do trato gastrointestinal de forma uni ou multifocal, sendo considerada uma manifestação heterogênea, de caráter multifatorial (Figura 6). Inicialmente, é caracterizada por inflamação superficial com formação de estreitamentos fibroestenósantes e transpassando a parede intestinal, que posteriormente evolui para a formação de fístulas (Hart & Ng, 2015).

Figura 6: Localização anatômica das lesões na doença de Crohn

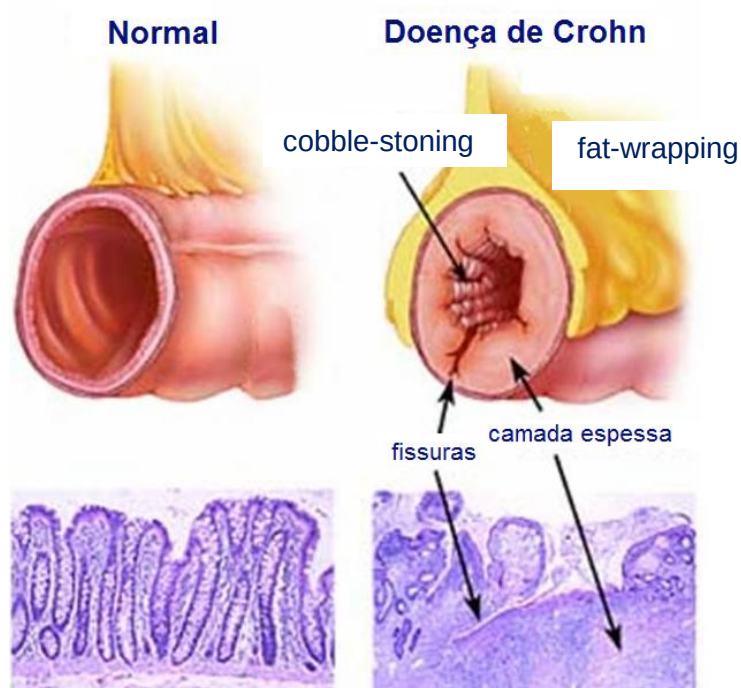


O processo inflamatório na DC é subsequente a uma resposta imunológica exacerbada e mediada pelos linfócitos T auxiliar 1 (Th1) e T auxiliar 17 (Th17), levando à produção de diversas citocinas inflamatórias, incluindo IFN- γ (interferon gama), interleucinas (IL) 6, 17A, 17F, 21, 22 e TNF- α (fator de necrose tumoral alfa), que desencadeiam o processo inflamatório e uma série de sinais e sintomas clínicos (Cho, 2008; Leal et al., 2013; Neurath, 2014; Shih & Targan, 2008).

A DC acomete de modo mais frequente a válvula ileocecal, seguida das porções distais do íleo terminal, do segmento do intestino delgado e do cólon ascendente. Macroscopicamente, notam-se áreas hiperêmicas permeadas por áreas de exsudação na serosa. A mucosa exibe úlceras aftóides que podem evoluir para úlceras hemorrágicas, serpiginosas ou lineares (Hart & Ng, 2015; Sartor, 2006).

Microscopicamente podem-se observar alterações na arquitetura de vilosidades e criptas e metaplasia pilórica (Figura 7). Na mucosa há aumento do infiltrado inflamatório linfoplasmocitário, além de macrófagos, eosinófilos e neutrófilos que se estendem da mucosa até a serosa (Hart & Ng, 2015). Os neutrófilos, durante a fase ativa da doença, agridem o epitélio glandular ocasionando as criptites ou formando microabcessos (Magro et al., 2013; Strober, Fuss & Mannon, 2007).

Figura 7: Aspectos histopatológicos gerais da doença de Crohn

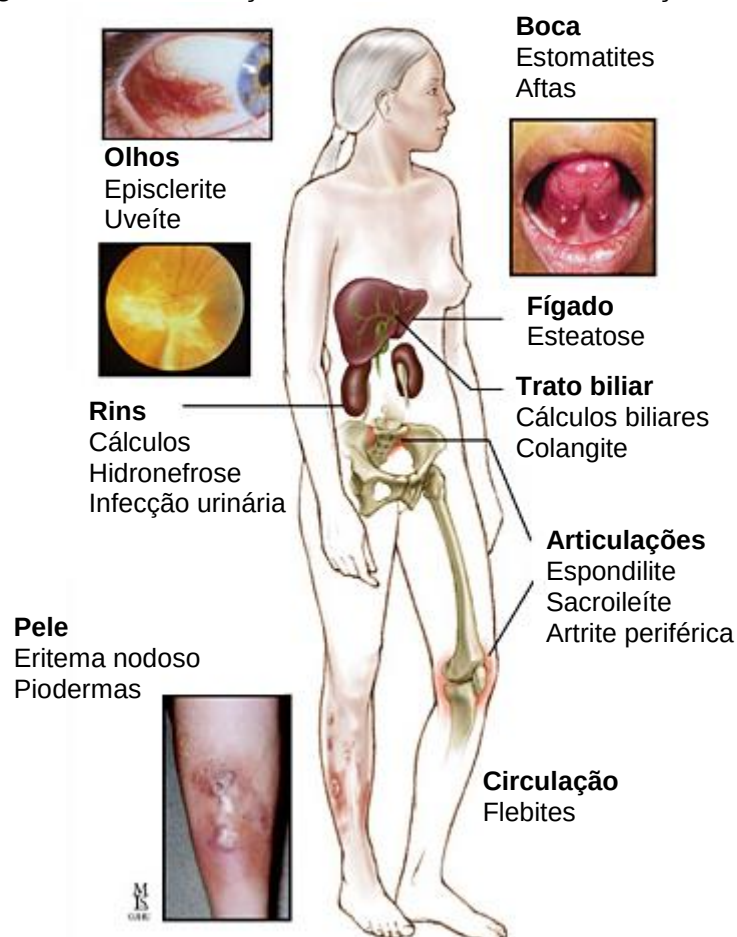


Fonte: <http://www.hopkinsmedicine.org/healthlibrary/conditions>

Os sinais e sintomas clínicos variam de acordo com o fenótipo (inflamatório, fistulizante ou estenosante) apresentado pelo paciente e incluem diarreia intermitente, dor abdominal, perda ponderal e sangramento retal. Estes fenótipos são determinados pela localização, extensão e severidade do padrão inflamatório, que tendem a permanecer constantes ao longo da vida do paciente diagnosticado e tratado precocemente (Hart & Ng, 2015; Peyrin-Biroulet et al., 2010).

Existe uma grande prevalência de manifestações extraintestinais (Figura 8), podendo ocorrer alterações cutâneas, renais, circulatórias, oculares, articulares e neoplásicas, tais como: uveíte, poliartrite migratória, sacroileíte, espondilite anquilosante, eritema nodoso, baqueteamento digital, adenocarcinoma intestinal (Evans & Pardi 2007; Mota et al., 2007).

Figura 8: Manifestações extraintestinais na doença de Crohn



Fonte: <http://www.hopkinsmedicine.org/healthlibrary/conditions/>

As metas do tratamento da DC incluem a indução e a cicatrização da mucosa. A escolha da terapia é fundamentada em estudos que avaliam a heterogeneidade

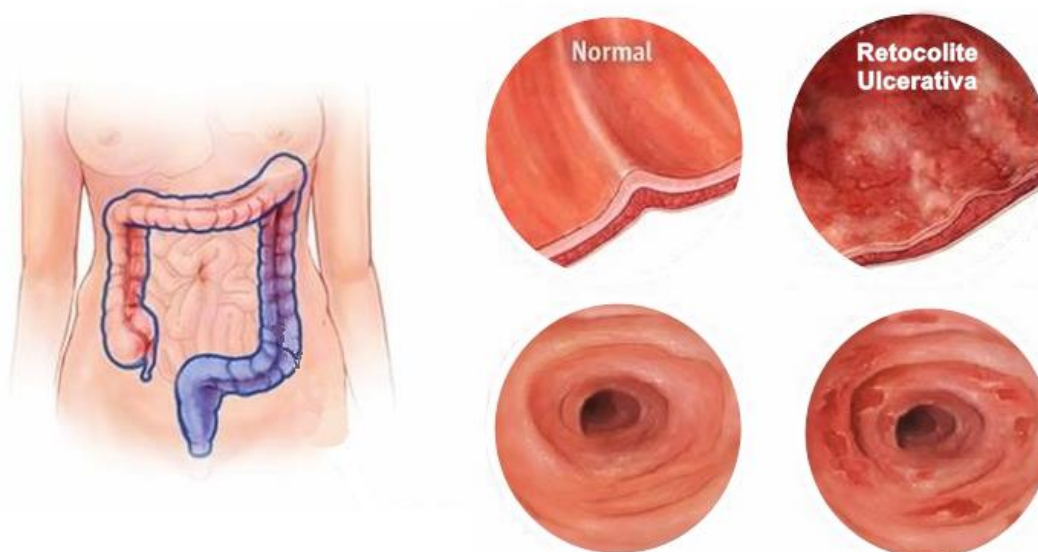
dos segmentos do trato gastrointestinal envolvidos, o padrão da doença, a severidade dos sintomas apresentados e a resposta a terapias anteriores (Ho et al., 2006). As opções terapêuticas incluem terapia biológica (fármacos anti-TNF e anti-integrinas), imunossuppressores, antimicrobianos e glicocorticoide. Usualmente as diretrizes preconizam uma abordagem farmacológica com utilização inicial de terapias menos tóxicas e resguardando as terapias com maior risco de toxicidade para os pacientes mais refratários (Stange et al., 2006).

As ressecções cirúrgicas ou enteroplastias, apesar de proporcionarem alívio imediato das complicações como estreitamentos e fístulas, não constituem um recurso curativo por ser comum a recorrência pós cirúrgica. Sendo assim, um recurso reservado aos casos de intratabilidade clínica ou doença refratária (Hwang & Varma, 2008).

2.4 Retocolite Ulcerativa

A retocolite ulcerativa (RCU) acomete a mucosa colorretal, raramente incluindo o íleo terminal. Ao contrário da doença de Crohn, a RCU normalmente não afeta a espessura completa da parede intestinal, permanecendo restrita à mucosa (Figura 9). O padrão inflamatório tende a ser simétrico, contínuo e difuso, não havendo mucosa sadia intercalando as lesões (Ho, Boyapati & Satsangi, 2015).

Figura 9: Localização anatômica das lesões na retocolite ulcerativa

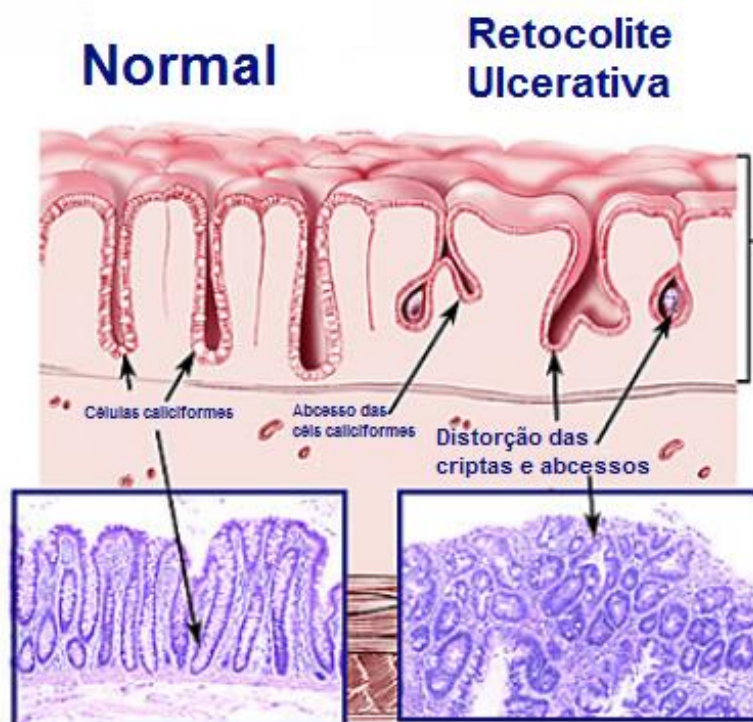


A resposta imunológica é dependente da ativação dos linfócitos T auxiliar 2 (Th2) e T auxiliar 17 (Th17), interleucinas (IL) 4, 5, 6, 13, 17, 21, 22, e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e mediada por células especializadas, tais como células *natural killer* (NK). Este padrão celular é responsável pela citotoxicidade das células epiteliais na RCU (Cho, 2008; Shih & Targan, 2008; Neurath, 2014).

A serosa não exibe alterações. Contudo, a mucosa exibe aparência hemorrágica, eritematosa e granular. As úlceras, quando presentes, são superficiais. Outro aspecto relevante é a presença de pseudopólipos frequentemente localizados no colón e no sigmóide (Ho, Boyapati & Satsangi, 2015; Sartor, 2006).

Histologicamente, nota-se a presença de distorção arquitetural das criptas e, eventualmente, está associada a presença de criptites e por aglomerados de neutrófilos no lúmen das criptas, os chamados abscessos crípticos (Figura 10). O infiltrado inflamatório exibe plasmocitose basal (Papi et al., 2013). Outras características incluem aumento de celularidade da lâmina própria, metaplasia das células de Paneth, depleção de muco, edema e atrofia da mucosa, congestão vascular e hemorragia focal (Magro et al., 2013; Rosenberg et al., 2013; Yantiss & Odze, 2006).

Figura 10: Aspectos histopatológicos gerais da retocolite ulcerativa



Os sintomas variam de acordo com a área comprometida e o grau de intensidade do processo inflamatório e incluem febre, inapetência, perda de peso e anemia. Do ponto de vista clínico, presença de sangue nas fezes é a queixa mais recorrente de pacientes com RCU associada com outros sintomas como diarreia, tenesmo, urgência evacuatória e dor abdominal (Walsh et al., 2014).

Assim como na DC, a RCU também apresenta manifestações extraintestinais durante a doença ativa, neste contexto citam-se as artrites periféricas, eritema nodoso, aftas orais e episclerite como as principais afecções relatadas (Evans & Pardi, 2007; Mota et al., 2007).

A RCU é classificada de acordo com o grau de intensidade e extensão da lesão que acomete os segmentos, podendo ser leve, moderada ou grave e definida como proctite ulcerativa quando limitada ao reto, colite distal quando o envolvimento compromete até a flexura esplênica e pancolite quando o envolvimento é proximal à flexura esplênica (Conrad, Roggenbuck & Laass, 2014).

Pacientes com RCU têm risco aumentado de desenvolver câncer colorretal quando comparado à população geral. O risco relativo é estimado em 2,75, ou seja, cerca de 20% dos pacientes poderão desenvolver câncer (Rogler, 2014). Este risco é proporcional à extensão e gravidade da lesão, ao tempo da doença e ao histórico familiar de câncer do cólon. Cabe ressaltar, que pacientes com DC com comprometimento do cólon apresentam os mesmos riscos que pacientes com RCU (Eaden, Abrams & Mayberry, 2001). A carcinogênese é atribuída a ativação prolongada das vias de sinalização responsáveis pela renovação celular constituem fatores determinantes para formação de lesões pré-malignas (Rubin et al., 2013).

Os segmentos farmacoterapêuticos de escolha para o tratamento da RCU se baseiam no uso de medicamentos anti-inflamatórios, imunossupressores e antimicrobianos. Outras propostas terapêuticas abrangem o uso de probióticos com a finalidade de restaurar o equilíbrio da microbiota entérica e oxigenoterapia hiperbárica para o tratamento das complicações fistulizantes (Sandborn, 2008; Stange et al., 2006).

A principal indicação de cirurgia eletiva inclui pacientes com quadro clínico não responsivo ao tratamento medicamentoso, pacientes com interferência direta na qualidade de vida e aqueles cuja sintomatologia só poderia ser controlada com tratamentos em longo prazo e com efeitos colaterais excessivos. O tratamento

cirúrgico da RCU, diferentemente da DC, tende a ser curativo (Hwang & Varma 2008; Metcalf, 2007).

2.5 Biomoléculas relacionadas as DII

Os marcadores laboratoriais clássicos de atividade inflamatória como VHS (velocidade de hemossedimentação), PCR (proteína C reativa), contagem de plaquetas e leucócitos, hemoglobina, ferro sérico, e albumina são utilizados para o acompanhamento de DII (Vermeire, Van Assche & Rutgeerts, 2006). Geralmente, na doença ativa ocorre aumento do número de leucócitos, mas o uso de corticóide, medida terapêutica frequentemente necessária nestes casos, pode ser responsável por este aumento. Portanto, os parâmetros acima descritos são inespecíficos para a DII ativa o que impossibilita a utilização como marcadores patognomônicos na prática clínica (Dubinsky, 2010; Lewis, 2011).

A colonoscopia com biópsia é descrita como melhor método para avaliar a inflamação, sua localização, extensão e gravidade. Neste cenário ainda indefinido de real avaliação da atividade inflamatória, pesquisadores têm buscado outros marcadores como fator de crescimento endotelial (EGF), fatores de coagulação e a IL-6 que possam estar ligados à inflamação (Farmer et al., 2000; Meuwis et al., 2007).

Proteínas de grânulos de neutrófilos têm sido marcadas e estudadas como indicadores de inflamação do trato gastrointestinal, incluindo calprotectina, lactoferrina, elastase de polimorfonucleares, lisozima, entre outras moléculas (Roszak et al., 2015). Estes biomarcadores de atividade inflamatória têm mostrado resultados promissores como ferramentas de diagnóstico e acompanhamento das enfermidades intestinais por não estarem elevados em condições inflamatórias extraintestinais, constituindo assim indicadores de lesão gastrointestinal (Iskandar & Ciorba, 2012; Jones et al., 2008).

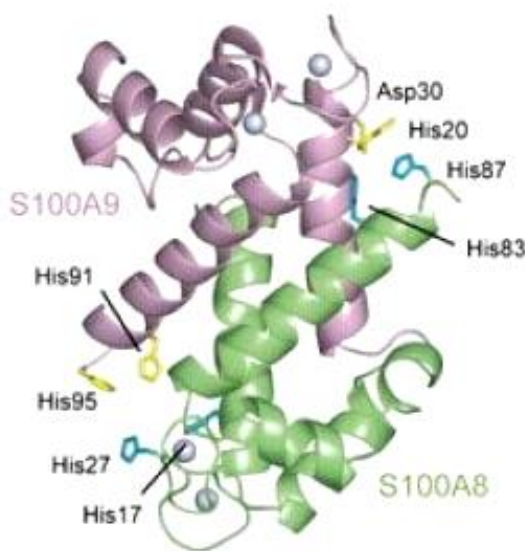
Alguns estudos têm comparado principalmente calprotectina e lactoferrina com avaliação colonoscópica e histológica na verificação da inflamação intestinal em pacientes com DII (Abraham & Kane, 2012; Cury et al., 2013; Guardiola et al., 2014). Outros autores demonstraram que os índices destas proteínas eram significativamente maiores em amostras de pacientes com doença ativa quando comparados com doença inativa, correlacionando-os aos índices de atividade CDAI

(do inglês *Crohn's Disease Activity Index*) e UCAI (do inglês *Ulcerative Colitis Activity Index*). Os resultados destes estudos são promissores, mostrando que estes marcadores são úteis para detectar a inflamação (Burri et al., 2013; D'Inca et al., 2007; García-Sánchez et al., 2010), diferenciar de outras afecções intestinais (Limburg et al., 2000; Sydora M, Sydora B & Fedorak, 2012), além de predizer a recidiva (Guidi et al., 2014; Lasson et al., 2014; Naismith et al., 2014).

2.6 Calprotectina

A calprotectina é uma proteína ligante de cálcio e zinco da família S-100 formada pelas subunidades S100A8 e S100A9 (Figura 11), expressa no citosol de neutrófilos, que apresenta funções imunorreguladoras (Erbayrak et al., 2009). Trata-se de um componente da resposta imune inata, que está diretamente associado à indução da apoptose, ao recrutamento de monócitos e inibição da proliferação celular e é liberado em consequência da ruptura celular. A calprotectina também apresenta ação microbicida através da inibição local de metaloproteinases dependentes do zinco (Smith & Gaya, 2012).

Figura 11. Estrutura molecular da calprotectina



Fonte: <http://cloud-clone.us/topic/Calprotectin-A-heterodimeric-complex-composed>

Por se tratar de uma proteína amplamente expressa em neutrófilos, esta se relaciona muito bem com a análise histopatológica, pois reflete as condições de

migração leucocitária possibilitando consequentemente a avaliação do grau e o tipo de inflamação estabelecida (Costa et al., 2005; Neubauer & Dudkowiak, 2010). Em processos infecciosos os níveis plasmáticos da calprotectina aumentam significativamente, podendo ser detectados na urina, saliva, plasma, líquido cefalorraquidiano e em biópsias. Existe uma correlação significativa entre a excreção calprotectina e à gravidade da inflamação, extensão e à combinação de ambos (Burri & Beglinger, 2012; El-badry, Sedrak & Rashed, 2010).

Níveis altos de calprotectina em pacientes com DII são resultantes do aumento da infiltração de neutrófilos na mucosa intestinal e a transmigração para o lúmen intestinal. Outras proteínas derivadas de neutrófilos como elastase, mieloperoxidase, lisozima parecem ter potencial como marcadores de inflamação gastrointestinal. Contudo, a calprotectina apresenta vantagem sob estas por representar 60% da proteína do citossol de neutrófilo (Gisbert & McNicholl, 2009).

A concentração de calprotectina em adultos saudáveis já foi bem estabelecida em vários estudos demonstrando um valor médio ao redor de 25mg/kg. Sendo, os valores acima de 50 mg/Kg considerados anormais (Voganatsi et al., 2001). Porém em pacientes com DII ativa, estudos tem demonstrado valores variando de 200mg/Kg a 20.000mg/Kg, estes achados sustentam a hipótese de que o aumento da calprotectina seja resultado da migração de neutrófilos da mucosa inflamada para o lúmen intestinal (Cury et al., 2013; Rogler et al., 2013).

2.7 Ensaios Quimiluminescentes

Os átomos ao absorverem energia, fazem transições entre seus níveis energéticos que são responsáveis pela excitação dos elétrons em orbitais moleculares ocupados de mais alta energia (HOMO, *highest occupied molecular orbitals*) para os orbitais desocupados de mais baixa energia (LUMO, *lowest unoccupied molecular orbitals*). As partículas-ondas que transitam entre os orbitais HOMO e LUMO emitem luz e são chamadas de fótons. O processo de emissão de luz através deste fenômeno é denominado luminescência, que pode ser classificada de acordo com o tipo de estímulo energético em quimiluminescência, fotoluminescência, bioluminescência, sonoluminescência, mecano ou triboluminescência, radioluminescência e termoluminescência (Bartolini et al., 2011).

A quimiluminescência (QL) é o processo de emissão de luz como produto ou um dos produtos de uma reação química definida pela primeira vez por Wiedemann em 1888. Existe uma diferenciação entre a QL e o fenômeno de emissão de luz devido a um aumento de temperatura, a incandescência, que seria um processo físico, não químico, decorrente da emissão de radiação. Portanto a QL pode ser definida como uma reação fria que envolve a formação de um estado eletrônico excitado a partir de uma complexa sequência reacional altamente exotérmica (Bartolini et al., 2011; Ferreira & Rossi, 2002; Roda, Seidel & Niessner, 2011).

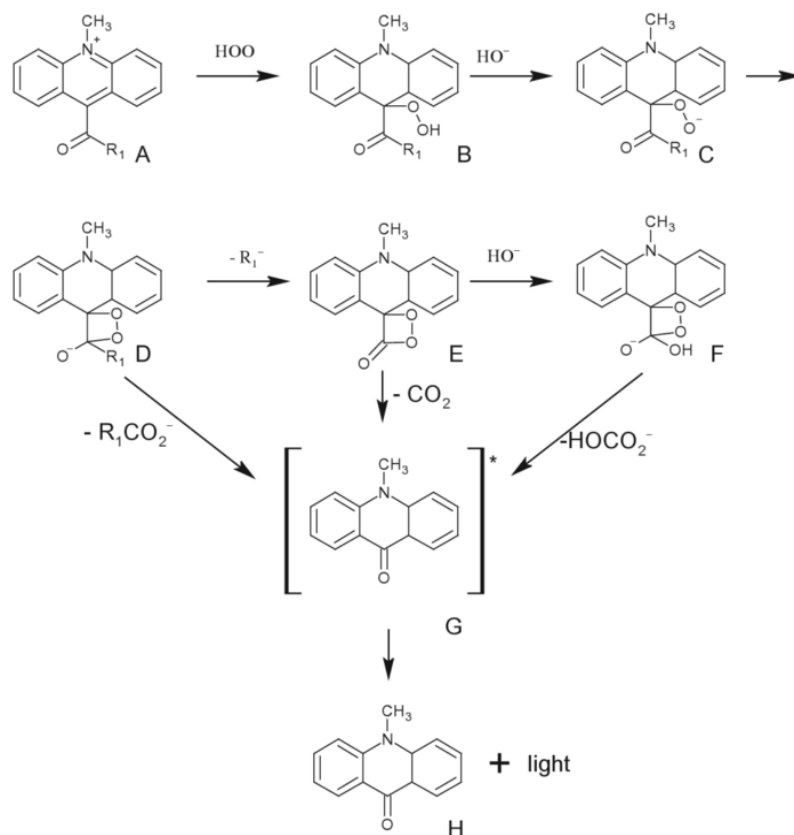
As substâncias quimiluminescentes, tais como lufina, lucigenina, etanodioato de bis, pirogalol, luciferina luminol, isoluminol e os derivados da acridina podem ser detectadas na faixa de femtomoles ou atomoles (10^{-15} a 10^{-18} mol), com sensibilidade superior aos ensaios espectrofotométricos (10^{-6} a 10^{-9} mol) e fluorimétricos (10^{-9} a 10^{-12} mol) (Ferreira & Rossi, 2002).

Devido a possibilidade de detecção ultrasensível, os ensaios de QL tem sido empregados em análises laboratoriais que requerem uma alta sensibilidade, como a determinação de citocinas, fatores de crescimento e proteínas relacionadas a processos patológicos específicos. Outras vantagens podem ser apontadas como a rapidez do teste, toxicidade inferior comparada à oferecida por radioisótopos, não agressão ao meio ambiente, amplo campo de aplicações analíticas e especificidade (Roda, Seidel & Niessner, 2011; Weeks et al., 1983).

A acridina ($C_{13}H_9N$) é um composto orgânico aromático, estruturalmente relacionado ao antraceno com um dos grupos centrais substituídos por nitrogênio. Os sais de acridina podem ser estimulados para produzir luz na presença de peróxido de hidrogênio em meio alcalino diluído e na ausência de um catalizador (Brown et al., 2009; Weeks et al., 1983).

O mecanismo de QL dos derivados de acridina foi elucidado por Weeks e colaboradores em 1983. O éster de acridina (EA), em especial, oxida rapidamente com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), devido da adição de íons de hidroperóxido ao anel acridina no carbono 9, seguido por clivagem da ligação éster fenólica (Figura 12). Esta sequência de reações leva a formação de N-metilacridona, que em estado excitado comporta-se como um composto emissor de fótons de curto período (aproximadamente 5 segundos) a 470 nm (Natrajan, 2010 et al.; Weeks, 1983 et al.).

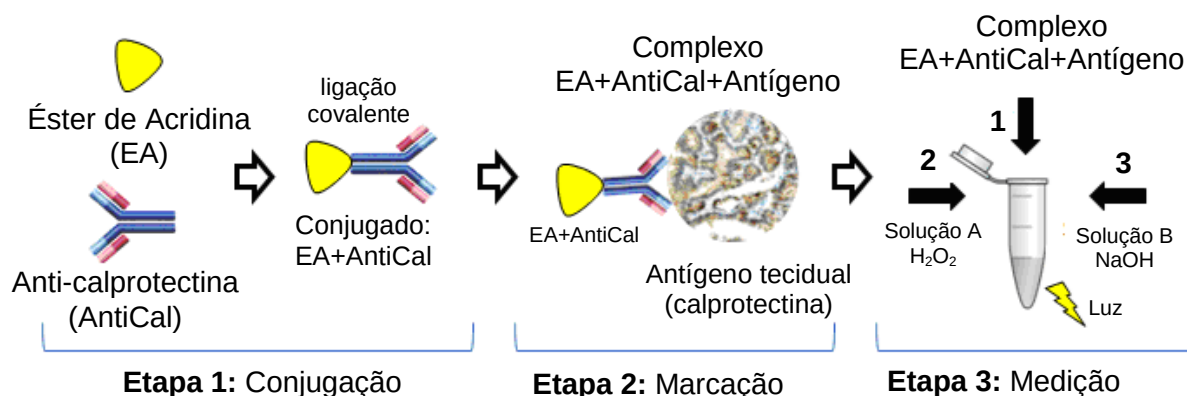
Figura 12: Esquema de reação quimiluminescente dos ésteres derivados de acridina



Fonte: Roda, 2011

Ensaio imunoquimiluminescente (Figura 13) apresentam elevada sensibilidade e estabilidade analítica. Estes se baseiam na detecção da emissão de luz, decorrente da reação entre o antígeno e anticorpo marcados por compostos quimiluminescente. O EA é capaz de se ligar covalentemente a anticorpos de amostras sorológicas e teciduais, produzindo compostos de alta quimiluminescência, que podem ser captados e quantificados por equipamentos capazes de transformar a luz emitida em impulsos elétricos (Brown et al., 2009; Natrajan et al., 2010).

Figura 13: Esquema de ensaio imunoquimiluminescente com éster de acridina



Fonte: Adaptado de Araújo-Filho, 2011

Na literatura, a aplicabilidade da quimiluminescência no estudo de doenças inflamatórias intestinais ainda é escassa. Contudo, Oldenburg et al (2001), mensurou, através de quimiluminescência, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) em amostras sanguíneas de pacientes com DC e RCU. Pode-se observar que a concentração de EROS em pacientes com DC ou RCU foi significativamente mais alta quando comparado a controles saudáveis.

2.8 Imunoistoquímica

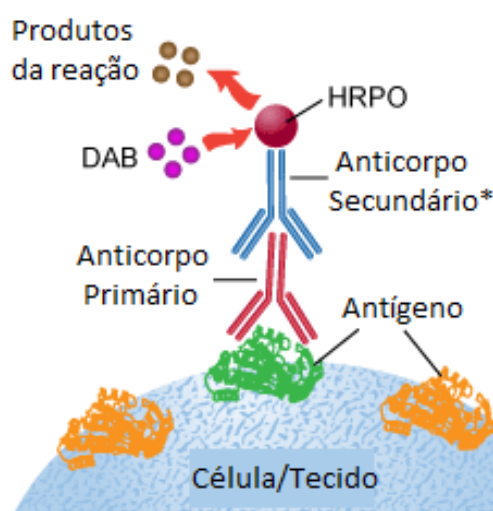
A técnica que utiliza a reação antígeno-anticorpo para a detecção e caracterização de moléculas em tecidos tem sido definida como imunoistoquímica. Sendo assim, a imunoistoquímica compreende um conjunto de metodologias em que se utilizam anticorpos como reagentes específicos capazes de identificar e estabelecer ligação com constituintes teciduais. Esta ligação permite situar e identificar a presença de moléculas específicas em tecidos por intermédio da cor que é associada ao complexo antígeno-anticorpo formado (Torlakovic et al., 2010).

As reações imunoistoquímica podem ser utilizadas na pesquisa médica na elucidação do tecido de origem de neoplasias; na subclassificação de doenças, na pesquisa de fatores prognósticos e terapêuticos; na identificação de estruturas e moléculas secretadas pelas células; entre outras aplicabilidades (Chan, 2000).

Os principais métodos aplicáveis a imunoistoquímica compreendem metodologias diretas ou indiretas. O método direto, no qual é utilizado um anticorpo primário marcado destaca-se por ser uma metodologia simples e rápida,

contudo tem como desvantagens, a pouca ampliação de sinal, pois existe somente uma molécula marcada por molécula de antígeno. Enquanto a metodologia indireta (Figura 14), apesar de mais complexa e demorada, é mais sensível, pois há maior número de moléculas marcadas por cada molécula de antígeno. Além de apresentar maior versatilidade e economia quando comparada ao método direto (Torlakovic et al., 2010).

Figura 14: Esquema da reação imunoistoquímica indireta



Fonte: Adaptado de <http://www.leinco.com/immunohistochemistry>

Os métodos de marcação imunoenzimáticos utilizam reações do tipo enzima-substrato para obterem produtos finais coloridos a partir de cromógenos incolores. A enzima mais utilizada é a Horseradish Peroxidase ou HRP obtida da raiz da *Armoracia rusticana* (Ramos-Vara, 2005).

A HRP, em presença de peróxido de hidrogênio, forma, numa primeira fase, um complexo enzima-substrato, e, posteriormente, oxida um doador de elétrons que permite a degradação do peróxido em água e oxigênio livre. Alguns doadores de elétrons uma vez oxidados tornam-se coloridos e, portanto são designados cromógenos. Este fato associado à capacidade de precipitarem no local da reação após a oxidação, permite a identificação e a localização de antígenos. O cromógeno mais utilizado é a 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloreto (DAB) que gera um precipitado castanho insolúvel em álcool e em outros solventes orgânicos (Ramos-Vara, 2005).

3. JUSTIFICATIVA

Por muitos anos, a presença de doenças inflamatórias intestinais (DII) foi considerada restrita à América do Norte e Europa. Estudos epidemiológicos demonstraram uma incidência crescente de doença de Crohn (DC) e retocolite ulcerativa (RCU) nas últimas décadas na América do Sul (Oliveira, Emerick & Soares, 2010).

No Brasil, onde a prevalência oficial ainda é considerada baixa, há pouca informação na literatura (Oliveira et al., 2007; Souza et al., 2011). Segundo o Datasus, entre janeiro de 2008 a outubro de 2016 foram gastos 25.073.923,45 reais com serviços médicos e hospitalares para o tratamento das DII.

As DII afetam pessoas de diferentes classes socioeconômicas, sexo e nacionalidades e representam um importante problema de saúde pública, já que acometem jovens em fase economicamente produtiva e têm evolução crônica e recidivante, afetando o estudo, o trabalho e a vida social. O curso clínico e os sintomas destas afecções crônicas a caracterizam como uma síndrome que compromete substancialmente a qualidade de vida dos pacientes acometidos por esta disfunção (Magalhães et al., 2014).

O diagnóstico precoce e diferencial é a chave para o controle e escolha da terapia farmacológica ideal para remissão da doença, evitando-se cirurgias ou tratamentos desnecessários (Souza et al., 2011).

O desenvolvimento de técnicas que possibilitam a análise de proteínas teciduais tais como a imunoistoquímica e a imunoquimiluminescência, trouxeram também uma renovação de esperanças quanto à possibilidade de obtenção de mais respostas na área das DII. A imunoquimiluminescência constitui um recurso de alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico e investigação de diversas doenças (Natrajan et al., 2010; Oldenburg et al., 2001).

Diante da importância da calprotectina no processo inflamatório do trato gastrointestinal, a análise dos níveis teciduais desta proteína irá contribuir para compreensão dos mecanismos patogênicos envolvidos na DC e na RCU e irá corroborar para o desenvolvimento de metodologias diagnósticas e de monitoramento do processo inflamatório (Iskandar & Ciorba, 2012; Lewis, 2011; Mendonza & Abreu, 2009).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Detectar, através de ensaios imunoquimiluminescente, imunoistoquímico e histomorfometria,, a presença da calprotectina em tecidos anorretais de pacientes diagnosticados com doenças inflamatórias intestinais.

4.2 Objetivos específicos

- Realizar um estudo histopatológico das amostras através das técnicas histoquímicas especiais;
- Otimizar um protocolo imunoquimiluminescente para detecção da calprotectina em biópsias de pacientes com doença de Crohn e retocolite ulcerativa;
- Identificar a expressão tecidual da calprotectina através de imunoistoquímica.
- Determinar quantitativamente, através da histomorfometria, a imunorreatividade da calprotectina nos preparados histológicos e comparar com os resultados obtidos no estudo imunoquimiluminescente.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Amostras

Foram selecionadas amostras de tecido anorretal de 39 pacientes com diagnóstico confirmado de DC (n = 9) e RCU (n = 30), regularmente atendidos no ambulatório de Proctologia do Hospital Barão de Lucena da Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco (SES/PE) no período de março de 2015 a junho de 2016 com a prévia autorização e anuência do responsável pelo setor. Como controles foram utilizadas amostras de tecido anorretal (n = 6) de cadáveres sem alterações gastrintestinais, com tempo de óbito inferior a 24 horas..

As amostras teciduais, obtidas através de biópsia (pinça Prof. Medina para biópsia 3 mm), foram embebidas em formalina a 10% tamponada, num volume final com aproximadamente 20 vezes o volume do material até o momento do processamento histológico.

5.2 Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE), sob Ofício nº 316/2010 CEP/CCS e Registro de Pesquisa CEP/CCS/UFPE nº 222/10 (Anexo I). As amostras de tecido foram obtidas após a anuência do paciente ou responsável legal através de assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo II).

5.3 Aspectos Epidemiológicos

A fim de se estabelecer correlações entre os possíveis agentes causais ou contributivos para a lesão em estudo, os fatores como gênero, faixa etária, raça, localização das lesões, histórico de câncer e doenças associadas foram obtidos através da aplicação do questionário sociodemográfico (Anexo III).

5.4 Estudo Histopatológico

As lâminas para montagem histológica foram quimicamente lavadas e desengorduradas com solução detergente. Após a limpeza, foi aplicada uma fina camada de resina extraída das folhas de Babosa (*Aloe vera*) garantindo a aderência e evitando o desprendimento do tecido durante os procedimentos de coloração.

Após a microtomia dos blocos de parafina, os cortes histológicos obtidos (5 µm) foram desparafinizados, hidratados e submetidos as técnicas de coloração hematoxilina e eosina (HE), tricrômico de Masson (TM), ácido periódico de Shiff (PAS) e azul de alcian (AB). Posteriormente, as lâminas foram desidratadas em etanol 95%, diafanizadas em xilol e montadas com lamínula e Entellan[®].

5.5 Estudo Imunoquimiluminescente

A conjugação do éster de acridina (EA) com o anticorpo foi realizada de acordo com o protocolo de conjugação desenvolvido por Weeks et al (1983) e utilizando o kit *Acridinium Ester Labeling Worksheet* (Enzo Life Sciences Catalog nº. ADI-907-001, USA). Para conjugação foram incubados 100 µL do anticorpo anti-calprotectina com 1 µL da solução de éster de acridina (EA) por 1h a 25° C, sob agitação constante. Para separação do conjugado (anticorpo-EA) dos demais constituintes (anticorpo não conjugado e EA-livre) a amostra foi submetida à cromatografia de exclusão molecular, por meio de uma coluna de Sephadex G-25 (10 x 1 cm) previamente incubada com tampão fosfato sódico (PBS), pH 7,2. Durante a eluição foram coletadas 15 alíquotas de 1 mL.

A quantidade de proteína das alíquotas foi determinada por avaliação da densidade óptica, através da leitura da absorbância na faixa de 280 nm, em espectrofotômetro modelo *Ultrospec 2100 pro* (Amersham Biosences, USA). Sendo considerada as alíquotas com valores superiores a 50 nm. Após a detecção dos picos, foi realizado um pool de proteínas com as frações conjugadas e realizada a dosagem de proteína através do método de Lowry (Campos et al., 2011).

A quimiluminescência do conjugado presente nas amostras foi mensurada pelo luminômetro tubo único módulo 9200-001 (Turner BioSystems, USA). Para desencadeamento da quimiluminescência é necessária a adição sequencial de 50 µL de uma solução 0,5% H₂O₂ e 0,1 N de ácido nítrico (solução A) a 50 µL de

amostra seguida de alcalinização rápida do meio a partir da adição de 50µL de NaOH a 0,25 N (solução B). A rápida conversão de derivados de acridina em suas pseudobases após a alcalinização requer cuidado para minimizar o tempo entre a adição do NaOH e a observação da intensidade da emissão de quimiluminescência medida em unidade de luz relativa (ULR).

Para a análise dos tecidos, as lâminas histológicas (0,3x0,3x8x10⁻⁴ cm) foram incubadas com 100 µL do anticorpo conjugado ao EA durante 2 horas a 4° C, posteriormente foram lavadas em PBS (20 mergulhos durante 5 minutos) e imersas em PBS por mais 5 minutos. Após a lavagem a amostra tecidual foi transferida para tubo de polipropileno (1,5 mL) com 100 µL de PBS. O estudo foi realizado em triplicata e os valores de URL dos tecidos marcados foram determinados através do luminômetro, seguindo o mesmo protocolo utilizado na conjugação do anticorpo ao EA descrito anteriormente.

5.6 Estudo Imunoistoquímico

Lâminas previamente limpas e tratadas com resina de *Aloe vera* receberam os cortes histológicos (5 µm). Foi realizada a desparafinização das lâminas contendo os tecidos em xilol e hidratação dos tecidos em bateria de álcool etílico (100%, 100% e 70%) até água destilada. As amostras teciduais foram cortadas em duplicata e então submetidas à imunoistoquímica para anticorpos monoclonais anti-calprotectina.

A recuperação antigênica foi feita com tampão citrato 100 mM pH 6,0 em panela de pressão por 2 minutos após fervura. Posteriormente, as amostras foram resfriadas até 35° C e então incubadas com solução de peróxido de hidrogênio por 30 minutos em temperatura ambiente para o bloqueio da peroxidase endógena. Posteriormente os tecidos foram incubados com anticorpos monoclonais anti-calprotectina (1:200) por 2 horas a 37° C em estufa.

A localização do anticorpo foi realizada utilizando-se o sistema de detecção *Reveal Biotin-Free Polyvalent DAB* (Biogen SPD-060, Brasil), sua revelação com DAB-H₂O₂ e contra-corados com hematoxilina. Todas as lavagens realizadas entre as etapas descritas utilizaram tampão fosfato de sódio 100Mm, pH 7,2 com NaCl 150 mM (PBS). Para o controle negativo, os anticorpos anti-calprotectina foi substituído por PBS.

5.7 Análise Histomofométrica Digital

O processo usado para análise das lâminas histológicas consistiu de um sistema de vídeo-câmera acoplado a um microscópio óptico (Olympus BH-2). O sistema interativo de análise de imagens utiliza o Software OPTIMAS[®] e Câmera digital CCBBW 410 (Samsung[®]), disponíveis no Laboratório de Morfometria e Análise de Imagens do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFPE.

Os parâmetros morfométricos adotados foram a área média total (μm^2) e o número de células marcadas por imunoistoquímica para a anti-calprotectina por campo captado na lâmina histológica. A análise quantitativa das células marcadas foi aferida utilizando sistema automático, estudando-se três campos em cada caso.

4.8 Análise Estatística

As comparações de distribuição entre variáveis foram realizadas através de métodos paramétricos Anova de fator único, Teste de Tukey e o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Foi considerado indicativo de significância estatística um valor de P menor que 0,05. Para estas análises foi utilizado o *software* OriginPro SR4 versão 8.0 (OriginLab Corporation, One Roundhouse Plaza, Northampton, MA 01060 USA).

6. RESULTADOS

6.1 Artigo 1



ARTIGO DE REVISÃO

Biomarcadores fecais úteis nas doenças inflamatórias intestinais: revisão sistemática

Fecal biomarkers useful on inflammatory bowel disease: a systematic review

Ana Paula Fernandes da Silva¹, Mario Ribeiro de Melo Júnior²

¹Mestranda do Programa de Pós-graduação em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE.

²Pesquisador do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) e Professor Adjunto do Departamento de Patologia, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE

Publicado em janeiro de 2016 na Revista Arquivos Ciências da Saúde
(Journal of Health Sciences) - QUALIS: B5

Submetido em 20/07/2015 Aceito para publicação em 10/11/2015

ISSN Impresso: 1807-1325 Eletrônico: 2318-3691

RESUMO

Introdução: A mucosa intestinal inflamada contém um grande número de neutrófilos e proteínas fecais derivadas dessas células, como a alfa-1-antitripsina, calprotectina, lactoferrina, elastase de polimorfonucleares, lisozima, entre outras moléculas, que são marcadas e estudadas como indicadores de inflamação do trato gastrointestinal. **Objetivo:** Mostrar as evidências científicas relacionadas aos biomarcadores inflamatórios fecais utilizados na prática médica, para avaliação da atividade doença e diagnóstico das doenças inflamatórias intestinais. **Material e Métodos:** Foram avaliados artigos das bases de dados BVS, SciELO, PubMed e *Science Direct*. Os descritores utilizados nesta revisão foram “*inflammatory bowel disease*” AND (“*biological markers*” OR “*fecal biomarkers*”). Foram considerados manuscritos publicados entre 2011 e junho de 2015, disponíveis na íntegra e publicados em língua inglesa. **Resultados:** Inicialmente foram identificados 184 artigos. A primeira seleção resultou em 44 artigos. A leitura e análise completas dos artigos resultaram em uma amostra final de 11 manuscritos. Verificou-se que a calprotectina esteve presente em todos os artigos revisados. Apenas um manuscrito avaliou o perfil de atividade da lactoferrina e nenhum artigo foi identificado que contemplasse os marcadores alfa-1-antitripsina e elastase de polimorfonucleares nas DII. **Conclusão:** Os achados deste estudo apresentaram a relação significativa dos biomarcadores fecais com o diagnóstico das doenças inflamatórias intestinais e o papel fundamental da calprotectina no estudo, diagnóstico e avaliação de recorrência pós-operatória.

Descritores: Doença inflamatória intestinal; Biomarcadores fecais; Calprotectina.

ABSTRACT

Introduction: The inflamed intestinal mucosa contains a large amount of neutrophils and fecal proteins derived from these cells, such as alpha-1-antitrypsin, calprotectin, lactoferrin, polymorphonuclear elastase, lysozyme, and other molecules that have been selected and studied as indicators of inflammation gastrointestinal tract. **Objective:** Show the scientific evidence related to the fecal inflammatory biomarkers used in medical practice for evaluation of the activity and diagnosis of inflammatory bowel disease. **Materials and Methods:** We searched the electronic databases of BVS, SciELO, PubMed, and Science Direct for a period spanning 2011 and June 2015. The descriptors used in this review were “*inflammatory bowel disease*” AND (“*biological markers*” OR “*fecal biomarkers*”). We considered full-text articles in English. **Results:** Initially, we identified 184 articles. The first selection resulted in 44 articles. After a complete reading and analysis of the articles, our final sample resulted in 11 articles. The calprotectin was found in all articles. Only one article evaluated the activity of lactoferrin profile. We did not identify articles documenting the alpha-1-antitrypsin markers and polymorphonuclear elastase in inflammatory bowel disease. **Conclusion:** The findings of this study showed a significant relationship of fecal biomarkers with a diagnostic of inflammatory bowel disease and the fundamental role of calprotectin in the study, diagnosis, and evaluation of postoperative recurrence.

Descriptors: Inflammatory bowel disease; Fecal biomarkers; Calprotectin.

INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias intestinais (DII) que incluem a doença de Crohn (DC) e retocolite ulcerativa (RCU) são descritas como condições crônicas de etiologia multifatorial marcadas por episódios recorrentes de inflamação do trato gastrointestinal⁽¹⁾. As taxas de incidência variam de 3,1 a 20,2 casos novos por 100.000 habitantes por ano para a DC e 2,2 a 19,2 por 100.000 habitantes para RCU. A prevalência é de mais de 200 casos por 100.000 habitantes no Ocidente⁽²⁻³⁾.

Embora haja divergências no que diz respeito à incidência, sítio anatômico de envolvimento, apresentação clínica, evolução e resposta terapêutica, os subtipos DC e RCU compartilham os mesmos aspectos etiológicos⁽⁴⁻⁵⁾. A incidência em ascensão, principalmente em países industrializados ocidentais, indicam que o surgimento das DII está relacionado à redução da frequência de infecções entéricas, decorrente das melhorias nas condições de higiene e armazenamento de alimentos⁽⁶⁾. Modelos experimentais e estudos clínicos propõem que esse surgimento é resultante da ação conjunta de fatores ambientais, imunológicos e genéticos que resultam em alterações na integridade da barreira mucosa intraluminal. O fluxo transepitelial de bactérias entéricas promove ativação da imunidade inata⁽⁷⁻⁹⁾.

Os sintomas dos pacientes podem ser indicadores de inflamação e atividade da doença, mas são subjetivos e, muitas vezes, influenciados por outros fatores não inflamatórios da doença, como a fibrose. A combinação dos sinais e sintomas dos pacientes com DII é utilizada em vários índices clínicos que foram criados para avaliar a atividade inflamatória⁽¹⁰⁻¹¹⁾. Os marcadores laboratoriais clássicos de atividade inflamatória como VHS (velocidade de hemossedimentação), PCR (proteína C reativa), contagem de plaquetas e leucócitos, hemoglobina, ferro sérico, e albumina são utilizados para o acompanhamento de DII⁽¹²⁾. Geralmente, na doença ativa ocorre aumento do número de leucócitos, mas o uso de corticoide, medida terapêutica frequentemente necessária nesses casos, pode ser responsável pelo aumento. Portanto, esses parâmetros são inespecíficos para a DII ativa, o que impossibilita a utilização como marcadores da atividade inflamatória na prática clínica⁽¹³⁻¹⁴⁾.

A coloscopia com biópsia é descrita como melhor método para avaliar a inflamação, sua localização, extensão e gravidade. Neste cenário ainda indefinido de real avaliação da atividade inflamatória, pesquisadores buscam outros marcadores, como interleucina 6, fator de crescimento endotelial (EGF) e fatores de coagulação que possam estar ligados à inflamação intestinal⁽¹⁵⁻¹⁶⁾.

De uma maneira geral, os marcadores fecais mostraram ter uma maior acurácia do que os marcadores séricos. A mucosa intestinal inflamada contém um grande número de

neutrófilos e proteínas fecais derivadas dessas células, como a alfa-1-antitripsina, calprotectina, lactoferrina, elastase de polimorfonucleares, lisozima, entre outras moléculas, que são marcadas e estudadas como indicadores de inflamação do trato gastrointestinal⁽¹⁷⁾.

O presente estudo objetivou mostrar as evidências científicas relacionadas aos biomarcadores inflamatórios fecais utilizados na prática médica para avaliação da atividade doença e diagnóstico das doenças inflamatórias intestinais.

METODOLOGIA

A presente revisão sistemática foi realizada entre os meses de maio e junho de 2015. Foram avaliados artigos de diferentes delineamentos disponíveis nas bases de dados Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), *Scientific Eletronic Library Online* (SciELO), *U.S. National Library of Medicine and the National Institutes Health* (PubMed) e *Science Direct*. Os descritores utilizados nesta revisão foram “*inflammatory bowel disease*” AND (“*biological markers*” OR “*fecal biomarkers*”), selecionados mediante consulta ao *Medical Subject Headings* (MeSH). Utilizando-se as ferramentas de busca avançada das bases de dados, a pesquisa dos descritores foi delimitada ao título, resumo e palavras-chave.

A identificação e seleção dos artigos foi realizada, considerando como critérios de inclusão artigos que avaliassem a associação de marcadores inflamatórios e doenças inflamatórias intestinais, publicados entre 2011 e junho de 2015, disponíveis na íntegra e publicados em língua inglesa. Quando o artigo completo não se encontrava disponível nas bases de dados, realizou-se uma busca na própria revista em que foi publicado, excluindo-se os que não possuíam acesso livre. Além disso, foi construída uma tabela adaptada do instrumento proposto por Downs & Black⁽¹⁸⁾, estabelecendo os requisitos populacionais e metodológicos para garantir a qualidade dos estudos e definir sua aceitação no estudo; foram excluídos os artigos de revisão e aqueles originais que apresentassem temas não pertinentes aos objetivos propostos.

Os biomarcadores considerados para avaliação foram alfa-1-antitripsina, elastase de polimorfonucleares, calprotectina e lactoferrina. Foram incluídos estudos que avaliassem a associação das doenças inflamatórias intestinais com um ou mais desses biomarcadores.

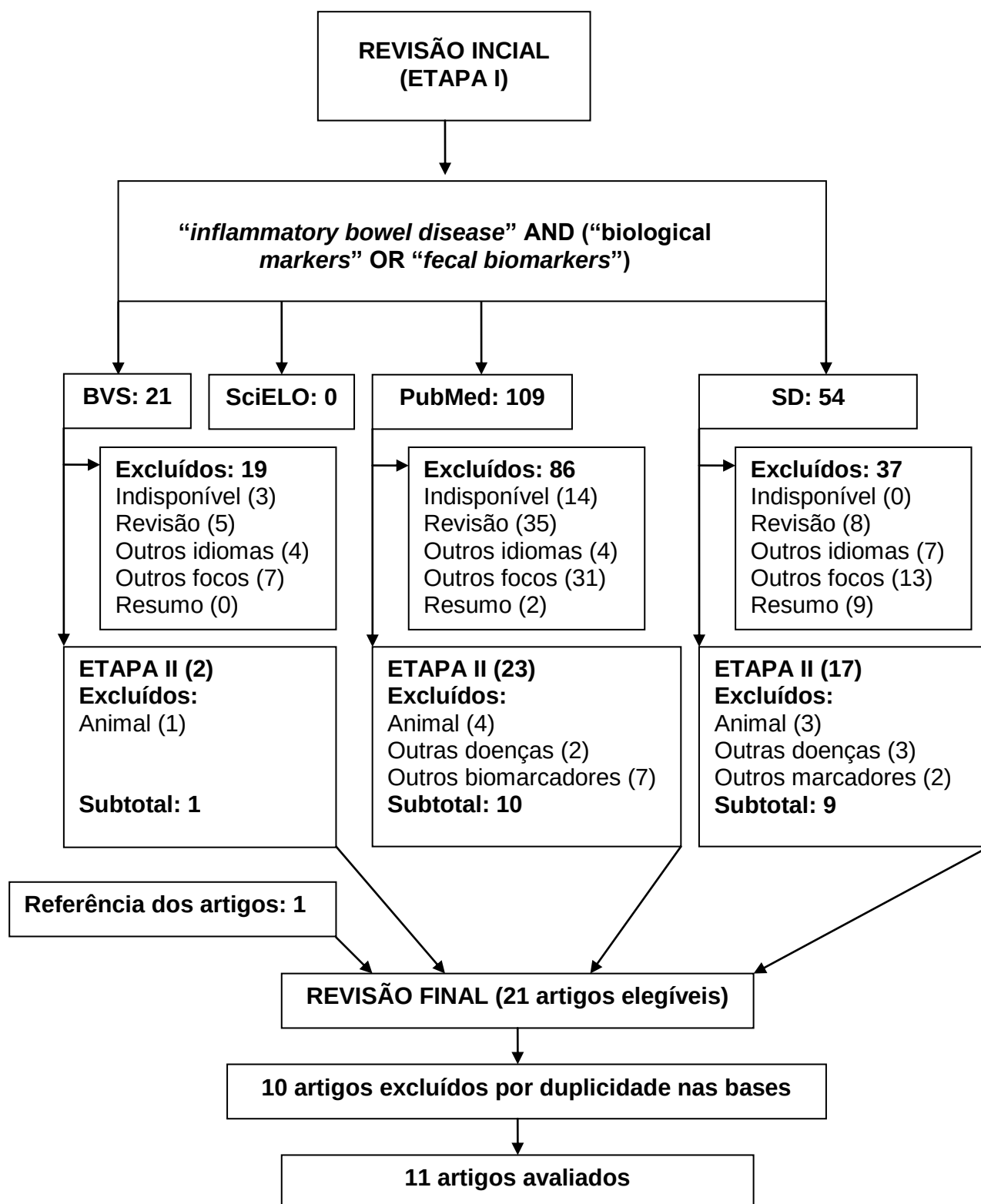


Figura 1: Fluxograma da seleção dos artigos para inclusão na revisão sistemática.

O processo de seleção dos estudos ocorreu em três etapas (Figura 1). Na primeira foi realizada a leitura dos títulos e resumos dos artigos encontrados. Posteriormente, procedeu-se com a leitura dos textos de manuscritos disponíveis na íntegra e, por último, a

identificação de possíveis artigos de interesse pela lista de referências. Além disso, artigos presentes em mais de uma das bases de dados tiveram as duplicatas excluídas.

RESULTADOS

Foram identificados 184 artigos a partir dos descritores utilizados. Foram encontrados para avaliação, na base de dados BVS, 21 artigos, na PubMed 109 e na Science Direct 54. Nenhum artigo foi encontrado na base SciELO.

A primeira seleção, baseada na análise dos títulos e resumos dos 184 artigos selecionados, resultou em 42 artigos, sendo dois na BVS, 23 na PubMed e 17 na Science Direct. Após a leitura completa dos artigos, 22 foram excluídos por não contemplarem os requisitos da pesquisa. Um novo artigo foi adicionado, usando-se a lista de referências. Desta forma, 22 estudos foram considerados elegíveis para análise. Entretanto, 10 artigos foram excluídos por duplicidade nas bases de dados, resultando em uma amostra final de 11 artigos.

A Tabela 1 apresenta a descrição dos artigos selecionados⁽¹⁹⁻²⁹⁾, segundo o local onde o estudo foi realizado, número da amostra (N), doença avaliada (DII para doenças inflamatórias intestinas, DC para Doença de Crohn, RCU para Retocolite Ulcerativa), biomarcador analisado no estudo e objetivos. Dos 11 trabalhos selecionados⁽¹⁹⁻²⁹⁾, nenhum foi realizado na América do Sul.

Todos os artigos revisados apresentaram delineamento de estudo observacional de caráter transversal. No que concerne à população avaliada, observou-se estudos com pacientes pediátricos^(19, 20, 24-26) e adultos^(21-23, 27-29).

Em relação aos biomarcadores, verificou-se que a calprotectina esteve presente em todos os artigos revisados⁽¹⁹⁻²⁹⁾. Apenas um artigo⁽²⁷⁾ avaliou o perfil de atividade da lactoferrina em associação com a RCU e nenhum artigo foi identificado que contemplasse os marcadores alfa-1-antitripsina e elastase de polimorfonucleares nas DII. No entanto, outros biomarcadores fecais foram descritos, como a *chitinase 3-like-1* (CHI3L1)⁽¹⁹⁾, a isoforma M2 do piruvato quinase (M2-PK)⁽²⁴⁾, a metaloproteinase da matriz do tipo 9 (MMP-9) e a beta-defensina humana 2 (HBD-2)⁽²⁶⁾.

Tabela 1: Características dos estudos com associação entre biomarcadores fecais e doenças inflamatórias intestinais, 2011/2015

Referência	Local	N ¹	Marcador	Objetivos
Aomatsu <i>et al</i> , 2011 ⁽¹⁹⁾	Japão	237	CHI3L1 ^a CP*	Comparar a CHI3L1 com a CP para avaliação da gravidade de DII** na pediatria.
Aomatsu <i>et al</i> , 2011 ⁽²⁰⁾	Japão	63	CP	Avaliar a precisão dos ensaio da CP como um marcador de atividade-doença das DII.
Sydora <i>et al</i> , 2012 ⁽²¹⁾	Canadá	50	CP	Comparar níveis de CP através do método padrão ELISA e Quantum Blue Reader® em pacientes com DII.
Labotón <i>et al</i> , 2013 ⁽²²⁾	Espanha	115	CP	Avaliar a capacidade da CP para prever a remissão endoscópica em pacientes com DC.
Wang <i>et al</i> , 2013 ⁽²³⁾	China	210	CP	Quantificar as concentrações da CP em doenças gastrintestinais e determinar o valor diagnóstico.
Burri <i>et al</i> , 2014 ⁽²⁴⁾	EUA	41	CP	Comparar os valores de várias mensurações da CP e investigar se esta indicaria a necessidade de escalonamento terapêutico na RCU**.
Czub <i>et al</i> , 2014 ⁽²⁵⁾	Polônia	116	CP M2-PK ^b	Comparar o perfil de atividade da CP e da M2-PK na avaliação da gravidade e atividade-doença na DC** e RCU em pacientes pediátricos.
Inoue <i>et al</i> , 2014 ⁽²⁶⁾	Japão	309	CP*	Investigar um método para quantificar a CP utilizando um ensaio com agregado de ouro coloidal para avaliar a inflamação da mucosa em DII pediátrica.
Kolho <i>et al</i> , 2014 ⁽²⁷⁾	Filândia	110	CP MMP-9 ^c HBD-2 ^d	Comparar os desempenhos da CP, MMP-9 e HBD-2 em pacientes com DII pediátricos.
Yamamoto <i>et al</i> , 2014 ⁽²⁸⁾	Japão	80	CP Lactoferrina	Avaliar a CP e lactoferrina na predição de recidivas em RCU.
Theede <i>et al</i> , 2015 ⁽²⁹⁾	Dinamarca	120	CP	Investigar a associação entre o nível de CP, a cicatrização da mucosa e atividade da doença em pacientes com RCU.

¹número de indivíduos; ^achitinase 3-like-; ^bisoforma M2 de piruvato-quinase; ^cmetaloproteinases de matriz 9; ^dbeta-defensina humana 2; *calprotectina; **DII (doença inflamatória intestinal) DC (doença de Crohn) RCU (retocolite ulcerativa).

A **Tabela 2** exibe os principais resultados e as respectivas conclusões dos autores dos artigos analisados nesta revisão sistemática.

Tabela 2: Principais resultados em ordem cronológica dos estudos com associação entre biomarcadores fecais e doenças inflamatórias intestinais, 2011/2015

Referência	Resultados principais	Conclusões
Aomatsu <i>et al</i> , 2011 ⁽¹⁹⁾	Os níveis de CHI3L1 ^a na RCU ativa teve média de 366,6 ng/g, na DC ativa 632,7 ng/g e nos controles média de 2,2 µg/g. O valor de corte de 13,7 µg/g previu lesões ativas com sensibilidade de 84,7% e especificidade de 88,9%.	A avaliação da concentração da CHI3L1 fecal pode ser uma ferramenta útil e alternativa para prever a gravidade da atividade inflamatória na mucosa nas DII**.
Aomatsu <i>et al</i> , 2011 ⁽²⁰⁾	Concentrações de CP* significativamente elevadas foram observadas em pacientes com atividade endoscópica ativa (mediana 1,562.5 µg/g).	A CP fecal é um marcador útil para a detecção da inflamação da mucosa nas DII em pacientes pediátricos.
Sydora <i>et al</i> , 2012 ⁽²¹⁾	A concentração média de CP no grupo de pacientes com DII foi mais elevada do que a encontrada em pacientes com síndrome do intestino irritável e indivíduos saudáveis (p = 0,01).	Ensaio de quantificação da CP constitui uma ferramenta útil de diagnóstico para distinguir as DII de outras doenças intestinais.
Wang <i>et al</i> , 2013 ⁽²³⁾	As concentrações de CP em pacientes com síndrome do intestino irritável e indivíduos saudáveis eram indistinguíveis.	O ensaio por Quantum Blue Reader® alcança a mesma precisão de medição da CP através de ELISA.
Labotón <i>et al</i> , 2013 ⁽²²⁾	A predição de remissão endoscópica usando o ensaio FC-QPOCT (teste rápido) cut-off de 272 µg/g e de 274 µg/g por FC-ELISA. Todos os pacientes com úlceras (n = 68) tiveram valores de CP > 250 µg/g. Os níveis de CP correlacionaram melhor com a atividade endoscópica na localização ileocolônica e pacientes que apresentaram atividade endoscópica tinham um nível de CP superior a 272 µg/g.	O estudo demonstrou a acurácia da CP em prever a remissão endoscópica através de teste quantitativo. E verificou a capacidade de discriminação entre diferentes graus de atividade endoscópica. Foi evidenciado uma boa correlação entre o teste rápido (FC-QPOCT) e o teste por ELISA.
Burri <i>et al</i> , 2014 ⁽²⁴⁾	Níveis de CP foram maiores em doença ativa (779,0 µg/g) que inativa (331,5 µg/g). O teste da CP identificou mais pacientes com a atividade da doença endoscópica (86,4%) do que o índice de atividade padrão (45,5%, P = 0,034).	Alterações de valores de CP podem indicar a recidiva clínica precocemente.
Czub <i>et al</i> , 2014 ⁽²⁵⁾	A concentração mais elevada da M2-PK ^b foi de 1849 U/g e de CP foi de 556 µg/ml, ambas em casos de RCU grave. Na DC as maiores concentrações de M2-PK e de CP foram de 770,4 U/g e 456 µg/ml, respectivamente.	A concentração da CP reflete melhor as condições de gravidade e de atividade das DII quando comparada a M2-PK.

Inoue <i>et al</i> , 2014 ⁽²⁶⁾	Níveis de CP, determinados pelo ensaio com agregado de ouro coloidal, estiveram fortemente correlacionados com o resultado endoscópico para a RCU ($r = 0,70$, $P < 0,01$) e CD ($r = 0,58$, $P < 0,01$).	O ensaio com ouro coloidal é um teste simples e rápido, que apresentou excelente desempenho para avaliar a inflamação da mucosa nas DII.
Kolho <i>et al</i> , 2014 ⁽²⁷⁾	Dentre os marcadores fecais estudados, a CP apresentou melhor desempenho. Para MMP-9 ^c , a área sob a curva foi de 0,837 (intervalo de confiança de 95%, 0,766-0,909). A HBD-2 ^d não possibilitou a categorização de qualquer um dos grupos estudados.	A CP foi o melhor marcador fecal em pacientes pediátricos com DII, mas a MMP-9 apresentou desempenho quase comparável em RCU, sugerindo aplicabilidade como um marcador substituto de inflamação.
Yamamoto <i>et al</i> , 2014 ⁽²⁸⁾	Os níveis de CP e lactoferrina foram significativamente mais elevados em doentes com recidiva do que aqueles em remissão clínica. Um valor de corte de 170 mg/g para CP teve uma sensibilidade de 76% e especificidade de 76% para prever recaída. Para a lactoferrina um valor de corte de 140 mg/g teve uma sensibilidade de 67% e uma especificidade de 68%.	A concentração da CP constitui um valor significativo para prever a recidiva na RCU. A CP fecal mostrou uma sensibilidade e especificidade mais acentuada quando comparada a lactoferrina fecal.
Theede <i>et al</i> , 2015 ⁽²⁹⁾	Um nível de corte de CP de 192 mg/kg foi identificado em pacientes com evidência endoscópica de cicatrização da mucosa. Um nível de corte de 171 mg/kg foi identificado em pacientes com evidência histológica para cicatrização da mucosa.	Níveis de CP aumentam significativamente com o aumento da atividade da doença endoscópica e histológica.

^a*chitinase 3-like-1*; ^bisoforma M2 de piruvato-quinase; ^cmetaloproteinases de matriz 9; ^dbeta-defensina humana 2; *calprotectina; **DII (doença inflamatória intestinal) DC (doença de Crohn) RCU (retocolite ulcerativa).

DISCUSSÃO

Estudos demonstraram⁽¹⁶⁻¹⁷⁾ que os índices de proteínas fecais são significativamente maiores em amostras de pacientes com doença ativa, quando comparados com doença inativa, correlacionando-os aos índices de atividade CDAI (do inglês *Crohn's Disease Activity Index*) para DC e UCAI (do inglês *Ulcerative Colitis Activity Index*) para RCU. Na última década, muitos estudos compararam principalmente a calprotectina e a lactoferrina com avaliação colonoscópica e histológica na verificação da inflamação intestinal em pacientes com DII⁽³⁰⁻³³⁾.

Conforme descrito na Tabela 2, nota-se que a calprotectina foi o biomarcador mais estudado e apresentou valores significativos de especificidade e sensibilidade para o

diagnóstico diferencial das DII em todos os artigos⁽¹⁹⁻²⁹⁾.

Níveis altos de calprotectina (CP) em pacientes com DII são resultantes do aumento da infiltração de neutrófilos na túnica mucosa intestinal e a transmigração para o lúmen intestinal. Outras proteínas derivadas de neutrófilos, como elastase, mieloperoxidase e lisoenzima parecem ter potencial como marcadores de inflamação gastrointestinal. Contudo, a calprotectina apresenta vantagem em relação às outras, por representar 60% da proteína do citossol do neutrófilo^(30,34).

Através de ensaio imunoenzimático, o biomarcador *chitinase 3-like-1* (CHI3L1) foi avaliado em experimentos *in vitro* utilizando células epiteliais do cólon humano demonstraram que as citocinas pró-inflamatórias são potentes indutores da expressão de CHI3L1⁽¹⁹⁾. Recentemente, um estudo com modelo experimental de colite em ratos, demonstrou que a CHI3L1 encontra-se aumentada em células epiteliais do colón e em macrófagos na mucosa inflamada de colite experimental e em pacientes com DII⁽³⁵⁾. Outro efeito patológico descrito na literatura é que a CHI3L1 permite a adesão e invasão bacteriana em células epiteliais do colo⁽³⁶⁾.

Em um estudo comparativo, avaliou-se o perfil de atividade da isoforma M2 de piruvato-quinase (M2- PK) e da calprotectina. A M2-PK é uma enzima citosólica que após a destruição de leucócitos no trato gastrointestinal, a proteína é liberada para o trânsito fecal. Apesar de ambas refletirem o grau de gravidade da inflamação da mucosa a calprotectina apresentou resultados mais satisfatórios⁽²⁵⁾.

Nas DII, também se observa um aumento na expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs). Em um estudo, a MMP-9 apresentou desempenho comparável a calprotectina em CU⁽²⁷⁾. Na DC, a MMP-9 tem sido associada a danos da mucosa e fístulas. Em outro estudo, verificou que as concentrações de MMP-9 nas fezes de pacientes RCU foram significativamente maiores do que em indivíduos saudáveis ou com doença do intestino irritável e estreitamente correlacionadas com avaliações endoscópicas⁽³⁷⁾.

Avaliou-se a expressão da beta-defensina humana 2 (HBD-2), que apesar de ser descrita como um importante marcador de inflamação do colo não apresentou resultados significativos⁽²⁷⁾.

A lactoferrina em pacientes com RCU tem a capacidade induzir à produção de citocinas pró-inflamatórias e apresenta ação antimicrobiana⁽²⁸⁾. Estudos demonstraram que a lactoferrina tem habilidade de estimular e promover a proliferação de células do epitélio intestinal⁽³⁸⁾.

CONCLUSÕES

Os achados deste estudo apresentaram a relação significativa dos biomarcadores fecais, principalmente da calprotectina, com o diagnóstico e atividade endoscópica das DII. Como podemos constatar nos artigos usados nesta revisão, os ensaios quantitativos da calprotectina, tanto na doença de Crohn quanto na retocolite ulcerativa, encontram-se consolidados na literatura científica e constituem uma ferramenta viável para o estudo, diagnóstico e avaliação de recorrência pós-operatória dessas doenças.

REFERÊNCIAS

1. Sachar DB, Walfish A. Inflammatory bowel disease: one or two diseases? *Current gastroenterology reports*. 2013;15(1):298-301.
2. Benchimol EI, Mack DR, Nguyen GC, Snapper SB, Li W, Mojaverian N, et al. Incidence, Outcomes, and Health Services Burden of Very Early Onset Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. 2014;147(4):803-13.
3. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011;140(6):1785-94.
4. Hart AL, Ng SC. Crohn's disease. *Medicine*. 2015;43(5):282-90.
5. Ho GT, Boyapati R, Satsangi J. Ulcerative colitis. *Medicine*. 2015;43(5):276-281.
6. Kanai T, Matsuoka K, Naganuma M, Hayashi A, Hisamatsu T. Diet, microbiota, and inflammatory bowel disease: Lessons from Japanese foods. *Korean Journal of Internal Medicine*. 2014;29(4):409-15.
7. Palmela C, Torres J, Cravo M. New Trends in Inflammatory Bowel Disease. *GE Portuguese Journal of Gastroenterology*. 2015;22(3):103-11.
8. McGovern DPB, Hysi P, Ahmad T, van Heel AD, Moffatt MF, Carey A, et al. Association between a complex insertion/deletion polymorphism in NOD1 (CARD4) and susceptibility to inflammatory bowel disease. *Human Molecular Genetics*. 2005;14(10):1245-50.
9. Peña AS. Contribution of genetics to a new vision in the understanding of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*. 2006;12(30):4784-7.
10. Beaugerie L, Seksik P, Nion-Larmurier I, Gendre JP, Cosnes J. Predictors of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2006;130(3):650-6.
11. Walsh AJ, Ghosh A, Brain AO, Buchel O, Burger D, Thomas S, et al. Comparing disease activity indices in ulcerative colitis. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2014;8(4):318-25.
12. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? *Gut*. 2006;55(3):426-31.
13. Dubinsky MC. Serologic and laboratory markers in prediction of the disease course in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*. 2010;16(21):2604-8.
14. Lewis JD. The utility of biomarkers in the diagnosis and therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2011;140(6):1817-26.
15. Farmer M, Petras RE, Hunt LE, Janosky JE, Galandiuk S. The importance of diagnostic accuracy in colonic inflammatory bowel disease. *American Journal of Gastroenterology*. 2000;95(11):3184-8.
16. Meuwis MA, Fillet M, Geurts P, Seny D, Lutteri L, Chapelle JP, et al. Biomarker discovery for inflammatory bowel disease, using proteomic serum profiling. *Biochemical Pharmacology*. 2007;73(9):1422-33.
17. Roszak D, Galecka M, Cichy W, Szachta P. Determination of faecal inflammatory marker concentration as a noninvasive method of evaluation of pathological activity in children with inflammatory bowel diseases. *Advances in Medical Sciences*. 2015;60(2):246-52.
18. Down SH, Black N. The feasibility of creating a checklist for the assessment of the methodological quality both of randomized and non-randomized studies of health care interventions. *Journal of cEpidemiology & Community Health*. 1998;52(6):377-84.
19. Aomatsu T, Imaeda H, Matsumoto K, Kimura E, Yoden A, Tamai H, et al. Faecal chitinase 3-like-1: A novel biomarker of disease activity in paediatric inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 2011;34(8):941-8.

20. Aomatsu T, Yoden A, Matsumoto K, Kimura E, Inoue K, Andoh A, Tamai H. Fecal calprotectin is a useful marker for disease activity in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Digestive Diseases and Sciences*. 2011;56(8):2372-7.
21. Sydora MJ, Sydora BC, Fedorak RN. Validation of a point-of-care desk top device to quantitate fecal calprotectin and distinguish inflammatory bowel disease from irritable bowel syndrome. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2012;6(2):207-14.
22. Lobatón T, López-García A, Rodríguez-Moranta F, Ruiz A, Rodríguez L, Guardiola J. A new rapid test for fecal calprotectin predicts endoscopic remission and postoperative recurrence in Crohn's disease. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2013;7(12):641-51.
23. Wang S, Wang Z, Shi H, Heng L, Juan W, Yuan B, et al. Faecal calprotectin concentrations in gastrointestinal diseases. *The Journal of international medical research*. 2013;41(4):1357-61.
24. Burri E, Beglinger C, Felten SV, Lehmann FS. Fecal Calprotectin and the Clinical Activity Index Are Both Useful to Monitor Medical Treatment in Patients with Ulcerative Colitis. *Digestive Diseases and Sciences*. 2014;60(2):485-91.
25. Czub E, Nowak JK, Szaflarska-Poplawska A, Grzybowska-Chlebowczyk U, Landowski P, Moczko J, et al. Comparison of fecal pyruvate kinase isoform M2 and calprotectin in acute diarrhea in hospitalized children. *Acta Biochimica Polonica*. 2014;61,(1):99-102.
26. Inoue K, Aomatsu T, Yoden A, Okuhira T, Kaji E, Tamai H. Usefulness of a novel and rapid assay system for fecal calprotectin in pediatric patients with inflammatory bowel diseases. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2014;29(7):1406-12.
27. Kolho KL, Sipponen T, Valtonen E, Savilahti E. Fecal calprotectin, MMP-9, and human beta-defensin-2 levels in pediatric inflammatory bowel disease. *International Journal of Colorectal Disease*. 2014;29(1):43-50.
28. Yamamoto T, Shiraki M, Bamba T, Umegae S, Matsumoto K. Fecal calprotectin and lactoferrin as predictors of relapse in patients with quiescent ulcerative colitis during maintenance therapy. *International Journal of Colorectal Disease*. 2014;29(4):485-91.
29. Theede K, Holck S, Ibsen P, Ladelund S, Nordgaard-Lassen I, Nielsen AM. Level of Fecal Calprotectin Correlates With Endoscopic and Histologic Inflammation and Identifies Patients with Mucosal Healing of Ulcerative Colitis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2015;13(11):1929-36.
30. Abraham BP, Kane S. Fecal Markers: Calprotectin and Lactoferrin. *Gastroenterology Clinics of North America*. 2012;41(2):483-95.
31. Boon GJ, Day AS, Mulder CJ, Gearry RB. Are faecal markers good indicators of mucosal healing in inflammatory bowel disease? *World Journal Gastroenterology*. 2015;21(40):11469-480.
32. Mańkowska-Wierzbicka D, Swora-Cwynar E, Poniedziałek B, Adamski Z, Dobrowolska A, Karczewski J. Usefulness of selected laboratory markers in ulcerative colitis. *European Cytokine Network*. 2015;26(2):26-37.
33. Schoepfer A, Reinisch W. Serial Fecal Calprotectin and Lactoferrin Measurements for Early Diagnosis of Pouchitis After Proctocolectomy for Ulcerative Colitis: Is Pouchoscopy No Longer Needed? *American Journal Gastroenterology*. 2015;110(6):888-90.
34. Guardiola J, Lobatón T, Rodríguez-Alonso L, Ruiz-Cerulla A, Arajol C, Loayza C, et al. Fecal Level of Calprotectin Identifies Histologic Inflammation in Patients With Ulcerative Colitis in Clinical and Endoscopic Remission. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2014;12(11):1865-70.
35. Mizoguchi E. Chitinase 3-like-1 exacerbates intestinal inflammation by enhancing bacterial adhesion and invasion in colonic epithelial cells. *Gastroenterology*. 2006;130(2):398-411.
36. Bohr S, Patel SJ, Vasko R, Shen K, Golberg A, Berthiaume F, et al. The Role of CHI3L1 (Chitinase-3-Like-1) in the Pathogenesis of Infections in Burns in a Mouse Model. 2015;10(11):1-19.
37. Mäkitalo L, Rintamäki H, Tervahartiala T, Sorsa T, Kolho KL. Serum MMPs 7-9 and their inhibitors during glucocorticoid and anti- TNF-therapy in pediatric inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2012;47(7):785-94.
38. Hagiwara T, Shinoda I, Fukuwatari Y, Shimamura S. Effects of lactoferrin and its peptides on proliferation of rat intestinal epithelial cell line, IEC-18, in the presence of epidermal growth factor. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 1995;59(10):1875-81.

6.2 Short communication

Apresentação oral no VI Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental

(a ser publicado na revista Experimental Pathology and Health Sciences)

HISTOPATHOLOGICAL ANALYSIS OF CRYPT CHANGES IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

ANA PAULA FERNANDES DA SILVA¹; GABRIELA AYRES FRAGOSO NASCIMENTO²; LUCIANO DE ALBUQUERQUE MELLO³; MARCELO DO REGO MACIEL SOUTO MAIOR¹; SILVANIA TAVARES PAZ¹; MARIO RIBEIRO DE MELO-JÚNIOR^{1,3}

1. Programa de Pós-graduação em Patologia, CCS/UFPE, Brazil; 2. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, CCS/UFPE, Brazil; 3. Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA/UFPE, Brazil.

Abstract

Inflammatory bowel disease including Crohn's disease and ulcerative colitis. The histological cuts of anorectal tissue from patients with IBD were submitted to hematoxylin and eosin, Masson's trichrome, alcian blue and periodic acid-Schiff stainings. Those results showed histopathological parameters used in the diagnostic of IBD patients, including crypt changes and chronic inflammation. Histopathological classification of IBD as UC or Crohn's disease is often difficult, but the distinction is very important for management of disease and choosing the optimal pharmacotherapeutic follow-up.

Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD) including Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are described as chronic conditions of multifactorial etiology characterized by recurrent episodes of inflammation of gastrointestinal tract¹.

Experimental models suggest that the emergence of these diseases is the result of joint action of environmental, immunologic and genetic factors that result in changes in the integrity of the mucosal barrier intraluminal^{1,2}.

Incidence rates of IBD vary from 3.1 to 20.2 new cases per 100,000 habitants per year for CD and from 2.2 to 19.2 per 100,000 inhabitants for UC².

Crohn's disease constitute a discontinuous and transmural disorder that can affect any portion of the gastrointestinal tract unilaterally or multifocal. Macroscopically, are noted hyperemic areas permeated by areas of exudation in

serous. The mucosa shows aphthous ulcers that may progress to bleeding ulcers, serpiginous or lineares³.

Ulcerative colitis affects, almost exclusively, the colorectal mucosa. The inflammatory pattern tends to be symmetrical, continuous and diffuse. The serous does not display changes and displays the mucosa hemorrhagic appearance, erythematous and granular. Another relevant aspect is the macroscopic presence of some pseudopolyps most often located in the colon⁴.

Materials and Methods

A thin layer of resin extracted from *Aloe vera* leaves was applied to the slides in order to ensure adherence and prevent tissue detachment during staining procedures. After the paraffin blocks underwent microtomy in triplicate, the histological cuts (5 μ m) of anorectal tissue from patients with IBD were deparaffinized, hydrated, and subjected to hematoxylin and eosin (HE) stain, Masson's trichrome (MT) stain, alcian blue (AB) and periodic acid–Schiff (PAS) stainings. Subsequently, the slides were dehydrated in ethanol, diaphonized in xylene, and mounted with glass slide and Entellan[®].

Results

The present study evaluated anorectal tissue from patients with IBD, Crohn's disease (5) and ulcerative colitis (5). The main alterations observed in DC was the presence of focal or anatomically discontinuous crypt distortion and normal mucosal surface (Figure 1A), diffuse chronic inflammation (Figure 1B), intense fibrosis (Figure 1C), segmental mucin and glycoproteins depletion (Figure 1D).

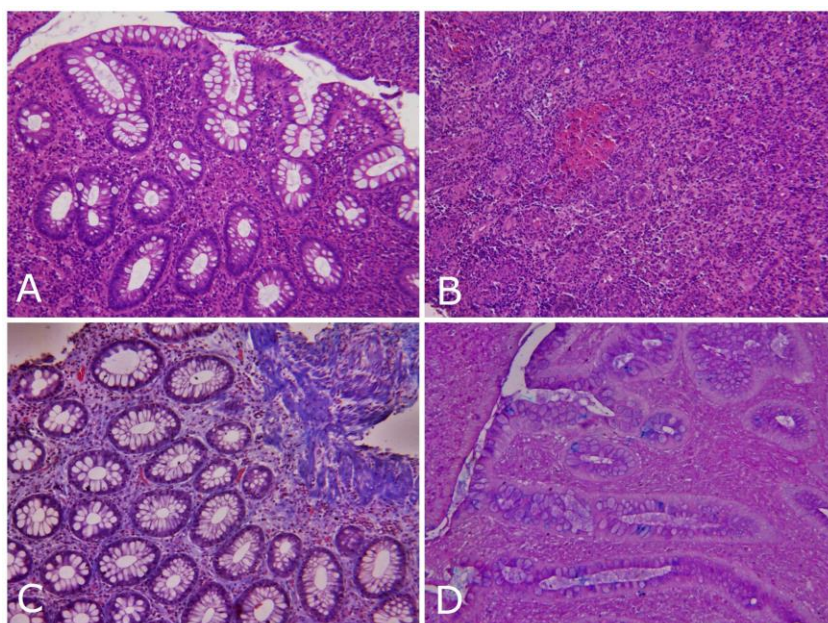


Figure 1. Crohn's disease. A. HE, 100x. B. HE, 100x. C. MT, 100x. D. AB/PAS, 100x

A diffuse distortion and atrophy of crypts in a colorectal biopsy, typical of UC was observed (Figure 2A), thin areas of fibrosis (Figure 2B) and mucin and glycoproteins depletion (Figure 2C 2D).

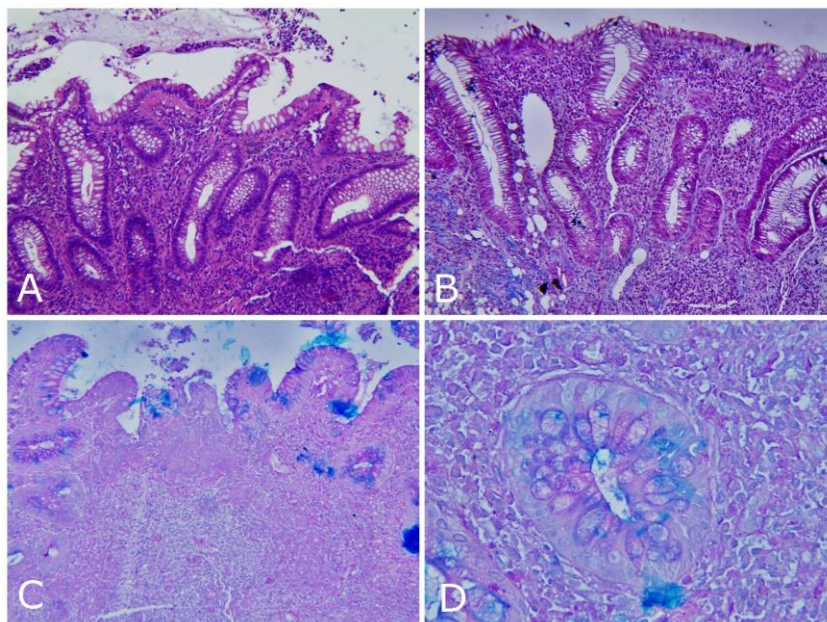


Figure 2. Ulcerative colitis. A. HE, 100x. B. MT, 100x. C. AB/PAS, 100x D. AB/PAS, 400x

Discussion and Conclusion

The histologic examination of endoscopic biopsies or resection specimens remains a key step in the work-up of affected IBD patients and can be used for differential diagnosis, particularly in the differentiation of UC from CD and other non-IBD related colitides⁵.

The combination of diffuse crypt changes is usually with associated chronic inflammation and is a strong pointer towards UC rather than CD. Crypt atrophy and distortion are more likely to be present in biopsies from UC than in those from CD, partly because they are often focal rather than extensive in the latter^{6,7}.

Mucin depletion may instinctively seem subjective and difficult to grade. However, interobserver agreement for the distinction between severe mucin depletion and lesser degrees of depletion is fairly good⁷.

Crohn's disease, particularly if severe, can show diffuse chronic inflammation at a single site and even at multiple sites⁷. The presence of granulomas discriminates more strongly than any other feature between UC and CD. Unfortunately, granulomas are confined to a minority of Crohn's disease biopsies⁵.

In conclusion, the histologic examination of biopsies remains a key step in the differential diagnosis of IBD. Histopathological classification of IBD as ulcerative colitis or Crohn's disease depends on identifying the microscopic features most useful for diagnosing and subclassifying, but the distinction is very important for management of disease and choosing the optimal pharmacotherapeutic follow-up.

References

1. Sachar, D. B.; Walfish, A. Inflammatory bowel disease: one or two diseases? *Current gastroenterology reports*. 2013;15;298.
2. Benchimol, E. I. et al. Incidence, Outcomes, and Health Services Burden of Very Early Onset Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. 2014;147(4);803-813.
3. Hart, A. L.; Ng, S. C. Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2015;43(5);282-290.
4. Ho, G. T.; Boyapati, R.; Satsangi, J. Ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2015;43(5);276-281.
5. Magro, F. et al. European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease. *Journal Crohns Colitis*. 2013;7(10);827-851.
6. Yantiss, R. K.; Odze, R. D. Diagnostic difficulties in inflammatory bowel disease pathology. *Histopathology*. 2006;48(2);116-132.
7. Feakins, R. M. Ulcerative colitis or Crohn's disease? Pitfalls and problems. *Histopathology*. 2014;64;317-335.

6.3 Artigo 2

Detecção imunoquimiluminescente e imunoistoquímica da calprotectina S100A8/A9 nas doenças inflamatórias intestinais

Immunochemiluminescent and immunohistochemistry detection of calprotectin S100A8/A9 in inflammatory bowel disease

Ana Paula Fernandes da Silva, Gabriela Ayres Fragoso do Nascimento, Maurílio Toscano de Lucena, Luiz Bezerra Carvalho Júnior, Mario Ribeiro de Melo Júnior.

Artigo a ser submetido a revista **Biomarkers**

Qualis CAPES: B1

Abstract

Calprotectin represents 60% of the protein content of the neutrophil cytoplasm and plays immunoregulatory and antimicrobial functions. On account of being a protein widely expressed in neutrophils, this is very well related to a histopathological analysis, because it reflects as conditions of leukocyte migration, thus allowing an evaluation of the degree and type of inflammation established. In present study, the anti-calprotectin antibody was subjected to conjugation with acridine ester for immunochemiluminescent detection and indirect immunohistochemistry to evaluate the inflammatory activity of anorectal tissues of patients with inflammatory bowel disease. Calprotectin was significantly increased in the injured tissues when compared to controls ($p < 0.05$) in both the chemiluminescent and immunohistochemical assays. High levels of calprotectin in patients with inflammatory bowel disease are results of increased neutrophil infiltration into the intestinal mucosa and a transmigration into the lumen gut.

Key words: Inflammatory bowel disease; Calprotectin; Immunochemiluminescent; Immunohistochemistry

Introdução

As doenças inflamatórias intestinais (DII) que incluem a doença de Crohn (DC) e retocolite ulcerativa (RCU) são descritas como condições crônicas de etiologia multifatorial marcadas por episódios recorrentes de inflamação do trato gastrointestinal [1].

Embora haja divergências no que diz respeito à incidência, sítio anatômico de envolvimento, apresentação clínica, evolução e resposta terapêutica, os subtipos DC e RCU compartilham os mesmos aspectos etiológicos [2,3].

Modelos experimentais e estudos clínicos propõem que este surgimento é decorrente da ação conjunta de fatores ambientais, imunológicos, microbiológicos e genéticos, que resultam em alterações na integridade da barreira mucosa intraluminal intestinal [4]. O fluxo transepitelial de bactérias entéricas promove ativação da imunidade inata desencadeando o processo patológico [5,6].

Na ausência de um sintoma patognomônico para o diagnóstico da DC que possibilite a diferenciação com a RCU, outras formas de enterocolites e a síndrome do intestino irritável, o diagnóstico diferencial é baseado na avaliação conjunta de dados clínicos, histórico do paciente, localização e extensão das lesões, exames contrastados de trânsito intestinal e análises laboratoriais, radiológicas, endoscópicas e histológicas [7,8].

A mucosa intestinal inflamada contém um grande número de neutrófilos e proteínas derivadas dessas células, como a alfa-1-antitripsina, elastase, calprotectina e lactoferrina. A calprotectina é uma proteína ligante de cálcio e zinco da família S-100 que representa 60% da proteína do citosol de neutrófilos e desempenha funções imunorreguladoras e antimicrobianas [9].

Níveis altos de calprotectina em pacientes com DII são resultantes do aumento da infiltração de neutrófilos na mucosa intestinal e a transmigração para o lúmen intestinal. Outras proteínas derivadas de neutrófilos como elastase, mieloperoxidase, lisoenzima parecem ter potencial como marcadores de inflamação gastrointestinal. Contudo, a calprotectina apresenta vantagem sob estas por representar 60% da proteína do citossol de neutrófilo [9].

A concentração de calprotectina em pacientes com DII ativa tem demonstrado valores variando de 200mg/Kg a 20.000mg/Kg, estes achados sustentam a hipótese

de que o aumento da calprotectina seja resultado da migração de neutrófilos da mucosa inflamada para o lúmen intestinal [10,11].

Os ensaios imunoquimiluminescentes baseiam-se na detecção da emissão de luz, decorrente da reação entre o antígeno e anticorpo marcado por composto quimiluminescente, como o éster de acridina e apresentam uma sensibilidade superior aos ensaios espectrofotométricos ou fluorimétricos por permitirem detecção na faixa de fentomoles ou atomoles (10^{-15} a 10^{-18} mol) com grande estabilidade analítica [12,13].

Neste estudo, o anticorpo anti-calprotectina foi submetido a conjugação com éster de acridina para detecção imunoquimiluminescente e a imunoistoquímica da calprotectina em tecidos anorretais de pacientes com doença de Crohn ou retocolite ulcerativa para avaliação da atividade inflamatória.

Materiais e Métodos

SELEÇÃO DE CASOS

Foram selecionadas amostras de tecido anorretal, obtidas através de biópsia (pinça Prof. Medina para biópsia 3 mm), de 39 pacientes com diagnóstico confirmado doença de Crohn (n=9) e retocolite ulcerativa (n=30), regularmente atendidos no ambulatório de Proctologia do Hospital Barão de Lucena da Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco. Como controles (n=6) foram utilizados tecido anorretal de cadáveres com tempo de óbito inferior a 24 horas.

A fim de se estabelecer correlações entre os possíveis agentes causais ou contributivos para a lesão em estudo, os fatores como gênero, faixa etária, localização das lesões, histórico de câncer e doenças associadas foram obtidos através da aplicação do questionário sociodemográfico

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (Ofício nº 316/2010).

CONJUGAÇÃO DO ÉSTER DE ACRIDINA AO ANTI-CALPROTECTINA

A conjugação do éster de acridina (EA) com o anticorpo S100A8/A9 Calprotectin (monoclonal antibody to human MRP8/14 BMA Biomedicals) foi realizada utilizando o kit *Acridinium Ester Labeling Worksheet* (Enzo Life Sciences Catalog nº. ADI-907-001). Para conjugação foram incubados 100 µL do anticorpo

anti-calprotectina com 1 µL da solução de EA por 1h a 25° C.

Para separação do conjugado (AntiCalprotectina-EA) dos demais constituintes (anticorpo não conjugado e EA-livre) a amostra foi submetida à cromatografia de exclusão molecular, por meio de uma coluna de Sephadex G-25 (10 x 1 cm) previamente incubada com tampão fosfato sódico (PBS), pH 7,2. Durante a eluição foram coletadas 15 alíquotas de 1 mL.

A quantidade de proteína das alíquotas foi determinada por avaliação da densidade óptica, através da leitura da absorbância na faixa de 280 nm, em espectrofotômetro modelo *Ultrospec 2100 pro* (Amersham Biosences).

DETECÇÃO IMUNOQUIMILUMINESCENTE

Para a análise dos tecidos, as lâminas histológicas (0,3x0,3x8x10⁻⁴ cm) foram incubadas com 100 µL do conjugado anticorpo-EA durante 2 horas a 4° C, posteriormente foram lavadas em PBS. Após a lavagem a amostra tecidual foi transferida para tubo de polipropileno (1,5 mL) com 100 µL de PBS.

A quimiluminescência do conjugado presente nas amostras foi mensurada pelo luminômetro tubo único módulo 9200-001 (Turner BioSystems). Para desencadear a reação de quimiluminescência é necessária a adição sequencial de 50 µL de uma solução 0,5% H₂O₂ e 0,1 N de ácido nítrico (solução A) a 50 µL de amostra seguida de alcalinização rápida do meio a partir da adição de 50µL de NaOH a 0,25 N (solução B).

ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

As amostras teciduais foram cortadas em triplicata e submetidas a imunoistoquímica indireta com o anticorpo anticalprotectina (S100A8/A9 Calprotectin (monoclonal antibody to human MRP8/14 BMA Biomedicals).

A recuperação do antígeno foi realizada com tampão citrato 100 mM pH 6,0 em panela de pressão durante 2 minutos após a ebulição. Subsequentemente, as amostras foram resfriadas até 35 ° C e depois incubadas com solução de peróxido de hidrogênio durante 30 minutos à temperatura ambiente para bloqueio da peroxidase endógena. Posteriormente, os tecidos foram incubados com anticorpos monoclonais anti-calprotectina (1: 200) durante 2 horas a 37°C.

A localização do anticorpo foi realizada utilizando o sistema de detecção Reveal Polyvalent Free Biotin-DAB (Biogen). Todas as lavagens efetuadas entre as

etapas utilizaram tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,2 com NaCl 150 mM (PBS). Para o controle negativo, o anticorpo anti-calprotectina foi substituído por PBS.

ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DIGITAL

Para análise quantitativa da imunoistoquímica, foram selecionados três campos em cada caso, onde foram captadas imagens com magnificação final em 400x. O Estudo histomorfométrico das imagens das lâminas histológicas foi realizado através de uma *workstation* composta por sistema de vídeo-câmera CCBBW 410 (Samsung®) acoplado a um microscópio óptico (Olympus BH-2) e computador contendo o *software* MOTIC Image Plus 2.0.

O parâmetro histomorfométrico adotado foi à distribuição da marcação da calprotectina (em pixels) por campo captado na lâmina histológica (área total do campo = 12.234 μm^2) utilizando-se o *software* GIMP – *GNU Image Manipulation Program*, versão 2.8.18.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

O *software* OriginPro SR4 versão 8.0 (OriginLab Corporation, One Roundhouse Plaza, Northampton, MA 01060 USA) foi utilizado para a análise estatística dos resultados obtidos a partir da imunoquimiluminescência e os dados foram expressos como média e desvio padrão.

Os dados obtidos no estudo histomorfométrico foram submetidos a anova de fator único, teste de Tukey e Shapiro-Wilk com nível de significância de 5% ($P < 0,05$), através do *software* GraphPad Prism® versão 7.0 (GraphPad Software Inc., USA).

Resultados

A população de estudo compreendeu três grupos: doença de Crohn (n=9) e retocolite ulcerativa (n=30), controle (n=6). A média de idade foi de 39 anos para DC e de 44 para RCU, a frequência foi maior em mulheres em ambos os grupos (55% para DC e 75% para RCU).

Os pacientes não relataram cânceres anteriores, contudo o histórico familiar em parentes de primeiro grau foi relatado em 7 pacientes com DC e em 19 com RCU. O consumo de álcool foi observado em 44% dos pacientes com DC, enquanto

que na RCU observamos em 29% dos casos. 55% dos pacientes com DC e 33% com RCU são fumantes ou fumaram por um período superior a 2 anos em algum momento da vida.

A marcação da calprotectina com o EA foi realizada e o conjugado (AntiCalprotectina-EA) foi separado através de cromatografia de exclusão molecular com uma coluna de Sephadex G-25 (Figura 1). A superposição dos picos de proteína e de quimiluminescência indicou que o anticorpo estudado foi marcado com EA. A AntiCalprotectina-EA foi encontrada em torno da quarta fração.

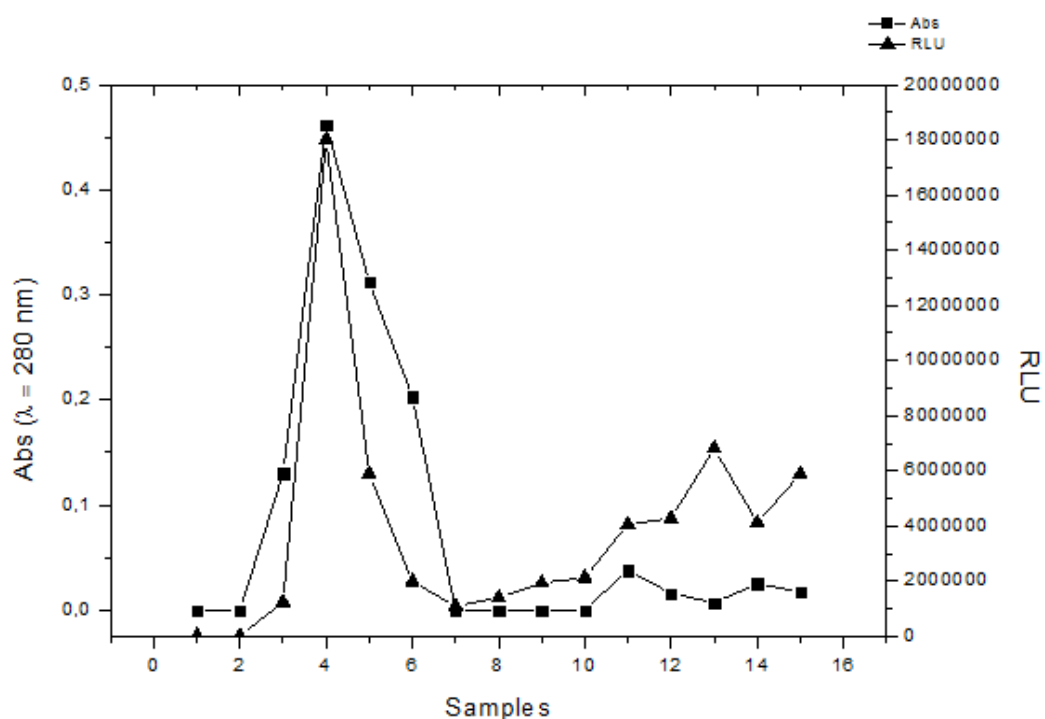


Figura 1: Perfil cromatográfico do conjugado (AntiCalprotectina-EA) numa coluna de Sephadex G-25 (10 x 1 cm). A eluição foi realizada com tampão fosfato 10 mM em NaCl 0,15 M (PBS), pH 7,2. Recolheram-se as frações (amostras de 1 ml) e mensurou-se absorbância e quimiluminescência.

O conjugado foi utilizado para investigar a presença da calprotectina em lesões inflamatórias relacionadas a DII e os resultados são apresentados na Figura 2. Foi constatado maior expressão da calprotectina nos grupos das doenças em comparação ao tecido anorretal normal. Os valores de ULR foram iguais a 308184 ± 69199 ULR com um intervalo 112846 a 590203 ULR de para DC e 271687 ± 65669 ULR com um intervalo de 101235 a 658948 ULR para RCU, enquanto que um valor de 4982 ± 2226 ULR foi encontrado no controle. O ensaio foi realizado em triplicata e o desvio padrão de todas as medições variou de 24,2% a 38,9% do valor médio.

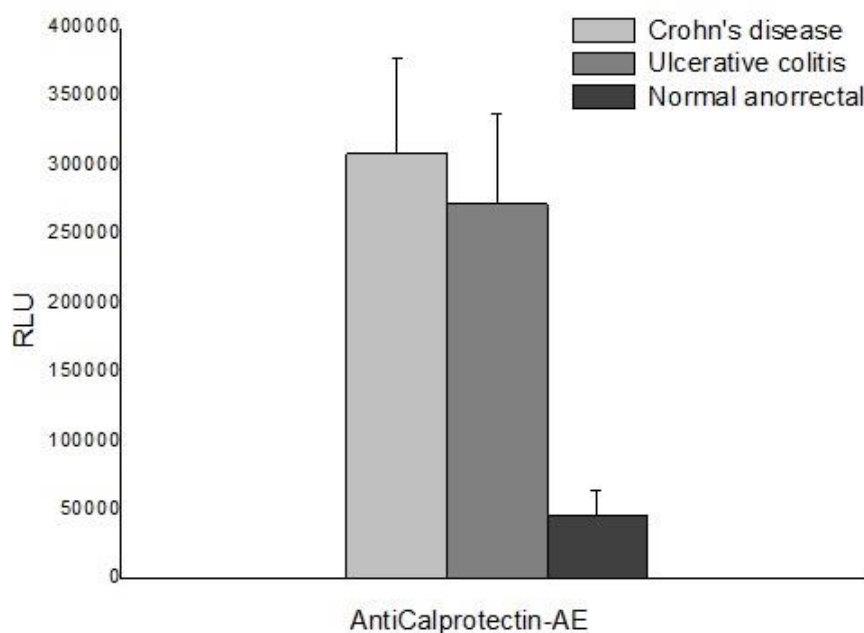


Figura 2. Comparação entre a imunoquimiluminescência da doença de Crohn (DC, n = 9), retocolite ulcerativa (RCU, n = 30) e anorretal normal (n = 6) marcado com AntiCalprotectina-AE. Observam-se variações estatisticamente significativas entre os valores de ULR das doenças inflamatórias intestinais e o controle.

Para a calprotectina, a média entre os valores de ULR dos grupos de DII e tecido anorretal normal foi significativamente diferente ($p < 0,05$), conforme observado com o teste estatístico paramétrico de Tukey. No entanto, não foram observadas variações estatisticamente significativas entre os valores de DC e RCU.

No estudo imunoistoquímico, foi constatada imunorreatividade significativa para a calprotectina. A expressão tecidual foi observada principalmente no citosol de células inflamatórias do tipo polimorfonucleares (Figura 3).

A análise das imagens permitiu a quantificação, em pixel, da imunorreatividade, demonstrando que a marcação da calprotectina foi mais intensa nos tecidos inflamados quando comparado aos tecidos clinicamente normais (Figura 4). A estatística paramétrica foi significativa com nível de confiança de $p < 0,05$ e Shapiro-Wilk 0,9167. Os dados morfométricos são relatados na Tabela 1.

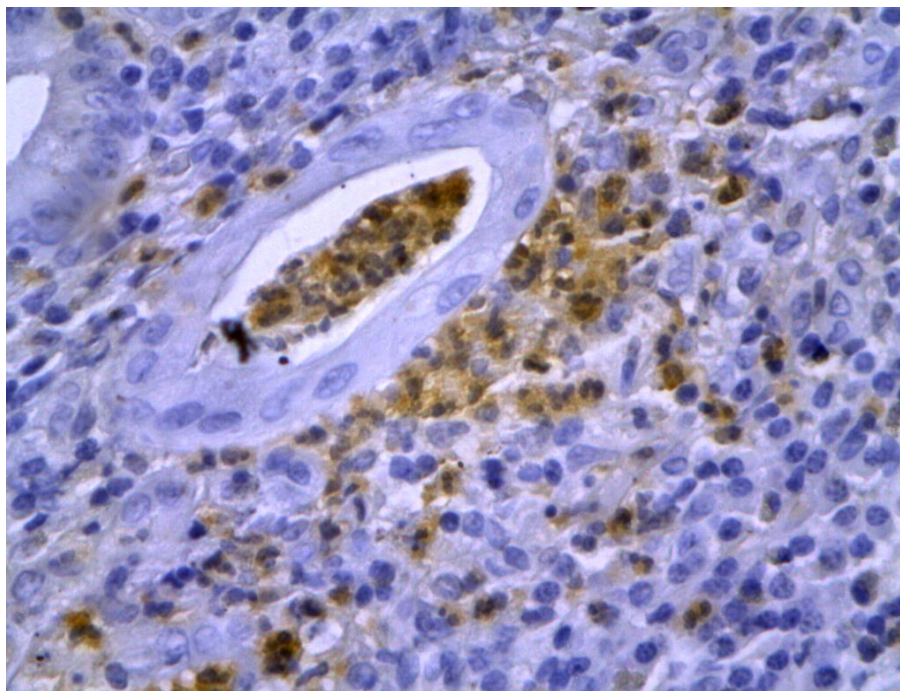


Figura 3. Expressão tecidual da calprotectina no citoplasma de neutrófilos em paciente com doença de Crohn. (Magnificação 400x).

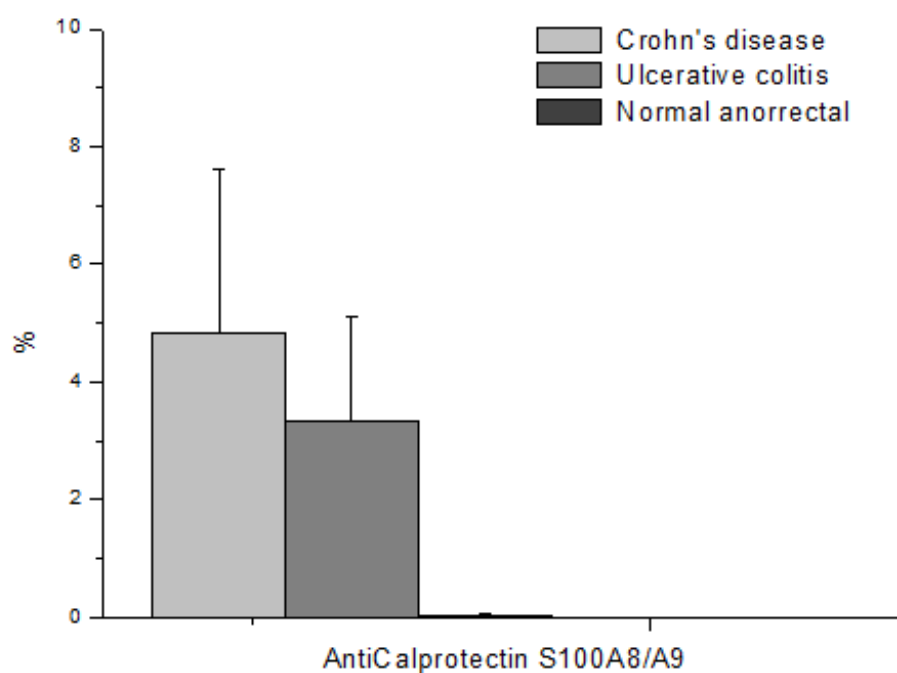


Figura 4. Percentual de quantificação da imunorreatividade (em pixel) da calprotectina por campo captado (área total 12.234 μm^2).

Tabela 1: Dados morfométricos da imunorreatividade da calprotectina

	Doença de Crohn		Retocolite Ulcerativa		Controle	
	Pixel	μ	Pixel	μ	Pixel	μ
Mínimo	15647	$4,13 \times 10^6$	7186	$1,9 \times 10^6$	53	14022,74
Máximo	87233	$2,3 \times 10^7$	57942	$1,5 \times 10^7$	543	143666,9
Média	37975	10×10^6	26411,8	$6,9 \times 10^7$	192,8	51019,8

Área total do campo de captura = $12.234 \mu\text{m}^2$

Discussão

A prevalência de DII no mundo ocidental é de até 0,5% da população geral e o aumento da taxa de incidência é mais acentuada nos países recém-industrializados. Estima-se um aumento exponencial no número de pacientes com DII que vivem no mundo ocidental durante a próxima década [14].

Populações com alta prevalência estabelecida, como regiões na América do Norte e na Europa apontam para uma maior frequência de DII entre a segunda e quarta década de vida, podendo acometer igualmente homens e mulheres. Nesse sentido, os resultados encontrados neste estudo acerca da distribuição etária e de gênero corroboram com os últimos achados epidemiológicos das DII [14,15].

Outros estudos apontam uma associação entre tabagismo e DC, enquanto a cessação do tabagismo, mas não o tabagismo atual, está associada a um risco aumentado de RCU. Gorduras saturadas, alcoolismo, depressão, sono prejudicado e baixos níveis de vitamina D também tem sido associados a DII incidentes [15,16].

A associação entre câncer, em especial o câncer colorretal, com as DII é amplamente reconhecida. A RCU, provavelmente por suas lesões serem contínuas e limitada a mucosa colorretal, apresenta prevalência mais significativa deste tipo de carcinoma colorretal quando comparada a DC [17].

A calprotectina (S100A8/A9) é uma proteína presente em neutrófilos, ativada durante o estresse celular, sendo considerada um importante *Damage Associated Molecular Pattern* (DAMP). Estudos clínicos recentes confirmam o valor de diagnóstico e de avaliação da atividade doença da calprotectina nas DII [18].

Estudos em humanos com DC e RCU [19,20] tem demonstrado uma correlação mais significativa da calprotectina fecal com os índices histológicos do que com os índices endoscópicos, sugerindo assim que sua detecção pode preceder a visualização macroscópica das lesões.

Em um estudo brasileiro, o nível médio de 686 µg/g, variando de 52,9 a 2542,8 µg/g de calprotectina em pacientes com DII foi descrito por Vieira *et al.* [21]. Kotze, et al., em outro estudo brasileiro de 2016, relatou valores de calprotectina fecal de 405,0 µg/g para DC, e de 457,0 µg/g para RCU, ambos com significância estatística relevante quando comparado aos valores observados na síndrome do intestino irritável 50,5 µg/g [22].

Walsham & Sherwood (2016), sugerem um algoritmo para o diagnóstico diferencial de doenças intestinais a partir dos valores de calprotectina, onde valores menores que 50 µg/g são indicativos de síndrome do intestino irritável, valores entre 50-150 µg/g sugerem infecções e outras formas de enterocolites e valores superiores a 150 µg/g estão relacionados a DC, RCU ou câncer colorretal [23].

Em nosso laboratório, o éster de acridina foi utilizado como marcador para anticorpos tumorais em imunoensaio quimiluminescente [24,25]. Através deste método, pequenas quantidades de antígeno podem ser detectadas nos tecidos dos pacientes. Os valores encontrados neste estudo para DC e RCU, 308184 ULR (intervalo de 112846 a 590203) e 271687 ULR (intervalo de 101235 a 658948), respectivamente, demonstram a elevada sensibilidade de detecção e estabilidade analítica dos ensaios imunoquimiluminescentes. O desvio padrão está relacionado aos valores de excreção da calprotectina, que depende diretamente do grau de extensão de lesões, podendo divergir entre os pacientes.

Os achados imunoistoquímicos do estudo estão de acordo com os padrões de marcação da calprotectina descritos na literatura [26] e reafirmam o potencial e acurácia da aplicação de metodologias quimiluminescentes para quantificação de antígenos teciduais.

Conclusões

A detecção imunoquimiluminescente possibilitou a quantificação da calprotectina em tecidos anorretais de pacientes diagnosticados com doenças inflamatórias intestinais, com significância estatística relevante quando comparado a avaliação do tecido normal.

Os resultados do imunoensaio quimiluminescente apresentaram correlação positiva significativa com o ensaio imunoistoquímico do estudo, ratificando a calprotectina como marcador eficiente para investigação das doenças do sistema

digestivo, principalmente na doença de Crohn e na retocolite ulcerativa.

Referências

- [1] Sachar, D. B.; Walfish, A. Inflammatory bowel disease: one or two diseases? **Current gastroenterology reports**, v. 15, n. 1, p. 298, 2013.
- [2] Hart, A. L.; Ng, S. C. Crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 43, n. 5, p. 282–290, 2015.
- [3] Ho, G. T.; Boyapati, R.; Satsangi, J. Ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v. 43, n. 5, p. 276–281, 2015.
- [4] Peña, A. S. Contribution of genetics to a new vision in the understanding of inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 30, p. 4784–4787, 2006.
- [5] McGovern, D. P. B. et al. Association between a complex insertion/deletion polymorphism in NOD1 (CARD4) and susceptibility to inflammatory bowel disease. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. 10, p. 1245–1250, 2005.
- [6] Palmela, C.; Torres, J.; Cravo, M. New Trends in Inflammatory Bowel Disease. **GE Portuguese Journal of Gastroenterology**, n. 20, 2015.
- [7] Kucharzik, T. et al. Recent understanding of IBD pathogenesis: implications for future therapies. **Inflammatory bowel diseases**, v. 12, n. 11, p. 1068–1083, 2006.
- [8] Maconi, G. et al. Accuracy and cost of diagnostic strategies for patients with suspected Crohn's disease. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 8, n. 12, p. 1684–1692, 2014.
- [9] Gisbert, J. P.; McNicholl, A. G. Questions and answers on the role of faecal calprotectin as a biological marker in inflammatory bowel disease. **Digestive and Liver Disease**, v. 41, n. 1, p. 56–66, 2009.
- [10] Cury, D. B. et al. Serum calprotectin levels correlate with biochemical and histological markers of disease activity in TNBS colitis. **Cellular Immunology**, v. 282, n. 1, p. 66–70, 2013.
- [11] Rogler, G. et al. Concept for a rapid point-of-care calprotectin diagnostic test for diagnosis and disease activity monitoring in patients with inflammatory bowel disease: expert clinical opinion. **Journal of Crohn's & colitis**, v. 7, n. 8, p. 670–7, 2013.
- [12] Ferreira, E. C; Rossi, A. V. A Quimioluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicações da reação do luminol em métodos de análise. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 1003–1011, 2002
- [13] Brown, R. C. et al. Development and application of a novel acridinium ester for use as a chemiluminescent emitter in nucleic acid hybridisation assays using chemiluminescence quenching. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 7, n. 2, p. 386–394, 2009.
- [14] Kaplan, G. G. The global burde of IBD: from 2015 to 2025. **Nature Reviews: Gatroenterology & Hepatology**, v. 12, n. 1, p. 720–727, 2015.

- [15] Ananthakrishnan, A. N. Epidemiology and risk factors for IBD **Nature Reviews: Gastroenterology & Hepatology**, v. 12, n. 1, p. 205–217, 2015.
- [16] Mahid, S. S. et al. Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 81, n. 1, p. 1462–1471, 2006.
- [17] Rogler, G. Chronic ulcerative colitis and colorectal cancer. **Cancer Letters**, v. 345, n. 2, p. 235–241, 2014.
- [18] Fengming, Y., Jianbing, W. Biomarkers of inflammatory bowel disease. **Disease Markers**, v. 2014, n. 1, p. 1–12, 2014.
- [19] Lobatón, T. et al. A new rapid test for fecal calprotectin predicts endoscopic remission and postoperative recurrence in Crohn's disease. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 7, n. 12, p. 641–651, 2013.
- [20] Burri, E., Beglinger, C., Felten, S. V., Lehmann, F. S. Fecal Calprotectin and the Clinical Activity Index Are Both Useful to Monitor Medical Treatment in Patients with Ulcerative Colitis. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 60, n. 2, p. 485–491, 2014.
- [21] Vieira, A., et al. Inflammatory bowel disease activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrin: correlation with laboratory parameters, clinical, endoscopic and histological indexes. **BMC Research Notes**, v. 2, n. 1, p. 221–227, 2009.
- [22] Kotze, L. M. S., Nisihara, R. M., Marion, S. B., Cavassani, M. F., Kotze, P. G. Fecal calprotectin: levels for the ethiological diagnosis in Brazilian patients with gastrointestinal symptoms. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 52, n. 1, p. 50–54, 2016.
- [23] Walsham, N. E., Sherwood, R. A. Fecal calprotectin in inflammatory bowel disease. **Clinical and Experimental Gastroenterology**, v. 9, n. 1, p. 21–29, 2016.
- [24] Lima, L. R. A., et al. Glycophenotype evaluation in cutaneous tumors using lectins labeled with acridinium ester. **Disease Markers**, v. 35, n. 3, p. 149–154, 2013.
- [25] Brustein, V. P., Cavalcanti, C. L. B., Melo-Junior, M. R. M., Correia, M. T. S., Beltrão, E. I. C., Carvalho-Jr, L. B. C. Chemiluminescent detection of carbohydrates in the tumoral breast diseases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 2, p. 268–275, 2011.
- [26] Leach, S. T., et al. Serum and mucosal S100 proteins, calprotectin (S100A8/S100A9) and S100A12, are elevated at diagnosis in children with inflammatory bowel disease. **Scandinavian Journal Gastroenterology**, v. 42, n. 11, p. 1321–1331, 2007.

7. CONCLUSÕES

- A utilização de biomarcadores específicos no estudo das DII corrobora para um melhor entendimento dos mecanismos e fatores envolvidos. Nessa perspectiva, estudos recentes apontam a calprotectina fecal como alternativa viável e complementar para avaliação do processo inflamatório, diagnóstico, acompanhamento e resposta terapêutica nestas doenças.
- Quanto à detecção imunoquimiluminescente, os resultados demonstraram que os valores de ULR da calprotectina nos grupos de DII e tecido anorretal normal foram significativamente diferentes, sendo bem maiores na DC e RCU, sucessivamente quando comparados ao tecido normal.
- Houve uma relação direta quando se comparou a quantificação imunoistoquímica para calprotectina com os valores obtidos no ensaio imunoquimiluminescente. A partir da análise estatística dos dados histomorfométricos, comparando-se a imunorreatividade entre os grupos doença e controle, foram encontradas diferenças significativas nos grupos estudados em ambas as técnicas.
- Os resultados mostraram que as análises teciduais utilizando a imunoquimiluminescência, devido a alta sensibilidade analítica do teste, constituem uma ferramenta valiosa na pesquisa e no estudo de biomarcadores histoquímicos.
- A expansão dos conhecimentos do papel da calprotectina tecidual na patogênese da DC e da RCU provavelmente oferecerá, no futuro, novas alternativas diagnósticas. Por fim, apesar de algumas questões não terem sido plenamente elucidadas, os conhecimentos fornecidos a partir desta pesquisa contribuem para melhorar o acompanhamento dos pacientes com DII.

REFERÊNCIAS

- Abraham, B. P.; Kane, S. Fecal Markers: Calprotectin and Lactoferrin. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 41, n. 2, p. 483–495, 2012.
- Araújo-Filho, J. L. S. Detecção de galectina-3 por imunoquimiluminescência em tecidos tumorais da próstata e tireóide. 2011. 102 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Bartoloni, F. H. et al. Luz: Um raro produto de reação. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 544–554, 2011.
- Benchimol, E. I. et al. Incidence, Outcomes, and Health Services Burden of Very Early Onset Inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology**, v. 147, n. 4, p. 803–813, 2014.
- Beaugerie, L. et al. Predictors of Crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 130 p. 650–656, 2006.
- Brown, R. C. et al. Development and application of a novel acridinium ester for use as a chemiluminescent emitter in nucleic acid hybridisation assays using chemiluminescence quenching. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 7, n. 2, p. 386–394, 2009.
- Burri, E. et al. Monoclonal antibody testing for fecal calprotectin is superior to polyclonal testing of fecal calprotectin and lactoferrin to identify organic intestinal disease in patients with abdominal discomfort. **Clinica Chimica Acta**, v. 416, p. 41–47, 2013.
- Burri, E.; Beglinger, C. Faecal calprotectin - A useful tool in the management of inflammatory bowel disease. **Swiss Medical Weekly**, v. 142, n. 4, p. 1–12, 2012.
- Cammarota, G. et al. The involvement of gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: Potential for therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 149, n. 1, p. 191–212, 2015.
- Campos, F.; Guillen, G.; Reyes, J. L.; Covarrubias, A. A. A general method of protein purification of recombinant unstructured non-acidic proteins. **Protein Expression and Purification**, v.80, n. 1, p. 47–51, 2011.
- Chan, J. K. Advances in immunohistochemistry: impact on surgical pathology practice. **Seminars in Diagnostic Pathology**, v. 17, n. 3, p. 170–7, 2000.
- Cho, J. H. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, n. 6, p. 458–466, 2008.
- Coelho, J. C. U. **Aparelho digestivo - Clínica e Cirúrgica**. 4. ed. São Paulo: ATHENEU, 2012. 3170 p., 28,5 cm. ISBN 97-885-3880-2969
- Conrad, K.; Roggenbuck, D.; Laass, M. W. Diagnosis and classification of ulcerative colitis. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. 4-5, p. 463–466, 2014.
- Cosnes, J. et al. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, v. 140, n. 6, p. 1785–1794, 2011.

Costa, F. et al. Calprotectin is a stronger predictive marker of relapse in ulcerative colitis than in Crohn's disease. **Gut**, v. 54, n. 3, p. 364–368, 2005.

Cury, D. B. et al. Serum calprotectin levels correlate with biochemical and histological markers of disease activity in TNBS colitis. **Cellular Immunology**, v. 282, n. 1, p. 66–70, 2013.

D'incà, R. et al. Calprotectin and lactoferrin in the assessment of intestinal inflammation and organic disease. **International Journal of Colorectal Disease**, v. 22, n. 4, p. 429–437, 2007.

Dubinsky, M. C. Serologic and laboratory markers in prediction of the disease course in inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 21, p. 2604–2608, 2010.

Eaden, J. A; Abrams, K. R.; Mayberry, J. F. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. **Gut**, v. 48, n. 4, p. 526–535, 2001.

El-badry, A.; Sedrak, H.; Rashed, L. Faecal calprotectin in differentiating between functional and organic bowel diseases. **Arab Journal of Gastroenterology**, v. 11, n. 2, p. 70–73, 2010.

Erbayrak, M. et al. The role of fecal calprotectin in investigating inflammatory bowel diseases. **Clinics (Sao Paulo, Brazil)**, v. 64, n. 5, p. 421–425, 2009.

Evans, P. E.; Pardi, D. S. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease: focus on the musculoskeletal, dermatologic, and ocular manifestations. **MedGenMed : Medscape general medicine**, v. 9, n. 1, p. 55, 2007.

Farmer, M.; Petras, R. E.; Hunt L. E.; Janosky, J. E.; Galandiuk, S. The importance of diagnostic accuracy in colonic inflammatory bowel disease. **American Journal of Gastroenterology**, v. 95, n. 11, p. 3184–3188, 2000.

Ferreira, E. C; Rossi, A. V. A Quimioluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicações da reação do luminol em métodos de análise. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 1003–1011, 2002

García-Sánchez, V. et al. Does fecal calprotectin predict relapse in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis? **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 4, n. 2, p. 144–152, 2010.

Garrett, W. S.; Gordon, J. I.; Glimcher, L. H. Homeostasis and Inflammation in the Intestine. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 859–870, 2010.

Geremia, A. et al. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. 1, p. 3–10, 2014.

Gisbert, J. P.; McNicholl, A. G. Questions and answers on the role of faecal calprotectin as a biological marker in inflammatory bowel disease. **Digestive and Liver Disease**, v. 41, n. 1, p. 56–66, 2009.

Guardiola, J. et al. Fecal Level of Calprotectin Identifies Histologic Inflammation in Patients With Ulcerative Colitis in Clinical and Endoscopic Remission. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 12, n. 11, p. 1865–1870, 2014.

Guidi, L. et al. Faecal calprotectin assay after induction with anti-Tumour Necrosis Factor α agents in inflammatory bowel disease: Prediction of clinical response and mucosal healing at one year. **Digestive and Liver Disease**, v. 46, n. 11, p. 974–979, 2014.

Hart, A. L.; Ng, S. C. Crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 43, n. 5, p. 282–290, 2015.

Ho, G. T. et al. The efficacy of corticosteroid therapy in inflammatory bowel disease: Analysis of a 5-year UK inception cohort. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 24, n. 2, p. 319–330, 2006.

Ho, G. T.; Boyapati, R.; Satsangi, J. Ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v. 43, n. 5, p. 276–281, 2015.

Hwang, J. M., Varma, M. G. Surgery for inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 17, p. 2678–2690, 2008

Iskandar, H. N.; Ciorba, M. A. Biomarkers in inflammatory bowel disease: Current practices and recent advances. **Translational Research**, v. 159, n. 4, p. 313–325, 2012.

Jones, J. et al. Relationships Between Disease Activity and Serum and Fecal Biomarkers in Patients With Crohn's Disease. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 6, n. 11, p. 1218–1224, 2008.

Kanai, T. et al. Diet, microbiota, and inflammatory bowel disease: Lessons from Japanese foods. **Korean Journal of Internal Medicine**, v. 29, n. 4, p. 409–415, 2014.

Kaplan, G. G. The global burde of IBD: from 2015 to 2025. **Nature Reviews: Gatroenterology & Hepatology**, v. 12, n. 1, p. 720–727, 2015.

Kucharzik, T. et al. Recent understanding of IBD pathogenesis: implications for future therapies. **Inflammatory bowel diseases**, v. 12, n. 11, p. 1068–1083, 2006.

Lakatos, P. L. et al. Current concept on the pathogenesis of inflammatory bowel disease-crosstalk between genetic and microbial factors: Pathogenic bacteria and altered bacterial sensing or changes in mucosal integrity take “tool”? **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 12, p. 1829–1841, 2006.

Lasson, A. et al. Fecal calprotectin one year after ileocaecal resection for Crohn's disease - A comparison with findings at ileocolonoscopy. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 8, n. 8, p. 789–795, 2014.

Leal, R. F. et al. Autophagy and proinflammatory cytokine expression in the intestinal mucosa and mesenteric fat tissue of patients with Crohn's disease. **Journal of Coloproctology**, v. 33, n. 1, p. 9–15, 2013.

Lewis, J. D. The utility of biomarkers in the diagnosis and therapy of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 140, n. 6, p. 1817–1826, 2011.

Limburg, P. J. et al. Fecal calprotectin levels predict colorectal inflammation among patients with chronic diarrhea referred for colonoscopy. **American Journal of Gastroenterology**, v. 95, n. 10, p. 2831–2837, 2000.

Loftus, E. V. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. **Gastroenterology**, v. 126, n. 6, p. 1504–1517, 2004.

Maconi, G. et al. Accuracy and cost of diagnostic strategies for patients with suspected Crohn's disease. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 8, n. 12, p. 1684–1692, 2014.

Magalhães, J. et al. Quality of life in patients with inflammatory bowel disease: importance of clinical, demographic and psychosocial factors. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 51, n. 3, p. 192–197, 2014.

Magro, F. et al. European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease. **Journal Crohns Colitis**, v. 7, n. 10, p. 827–851, 2013.

Malhotra, R. et al. High Prevalence of Inflammatory Bowel Disease in United States Residents of Indian Ancestry. **Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association**, v. 13, n. 4, p. 683–689, 2014.

McGovern, D. P. B. et al. Association between a complex insertion/deletion polymorphism in NOD1 (CARD4) and susceptibility to inflammatory bowel disease. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. 10, p. 1245–1250, 2005.

Mendoza, J. L.; Abreu, M. T. Biological markers in inflammatory bowel disease: practical consideration for clinicians. **Gastroenterologie clinique et biologique**, v. 33, n. 3, p. 158–173, 2009.

Metcalf, A. Elective and emergent operative management of ulcerative colitis. **Surgical Clinics of North America**, v. 87, n. 3, p. 633–641, 2007.

Meuwis, M. A. et al. Biomarker discovery for inflammatory bowel disease, using proteomic serum profiling. **Biochemical Pharmacology**, v. 73, n. 9, p. 1422–1433, 2007.

Molodecky, N. A. et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. **Gastroenterology**, v. 142, n. 1, p. 46–54, 2012.

Mota, E. S. et al. Manifestações extra-intestinais em doença de Crohn e retocolite ulcerativa: prevalência e correlação com o diagnóstico, extensão, atividade, tempo de evolução da doença. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 27, n. 4, p. 349–363, 2007.

Naismith, G. D. et al. A prospective evaluation of the predictive value of faecal calprotectin in quiescent Crohn's disease. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 8, n. 9, p. 1022–1029, 2014.

Natrajan, A. et al. Enhanced immunoassay sensitivity using chemiluminescent acridinium esters with increased light output. **Analytical Biochemistry**, v. 406, n. 2, p. 204–213, 2010.

Neubauer, K.; Dudkowiak, R. Fecal Markers in Inflammatory Bowel Disease. **Advances In Clinical and Experimental Medicine**, v. 19, n. 2, p. 251–255, 2010.

Neurath, M. F. Cytokines in inflammatory bowel disease. **Nature reviews Immunology**, v. 14, n. 1, p. 329–342, 2014.

Oldenburg, B. et al. Chemiluminescence in inflammatory bowel disease patients: a parameter of inflammatory activity. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 310, n. 2, p. 151–156, 2001.

Oliveira, S. et al. Quality-of-life measurement in patients with inflammatory bowel disease receiving social support. **Inflammatory bowel diseases**, v. 13, n. 4, p. 470–474, 2007.

Oliveira, F. M.; Emerick, A. P. D. C.; Soares, E. G. Epidemiology aspects of inflammatory bowel disease in the east region of Minas Gerais State. **Ciência & saúde coletiva**, v. 15, n. 15, p. 1031–7, 2010.

Palmela, C.; Torres, J.; Cravo, M. New Trends in Inflammatory Bowel Disease. **GE Portuguese Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 3, p. 103–111, 2015.

Papi, C. et al. Mucosal healing in inflammatory bowel disease: Treatment efficacy and predictive factors. **Digestive and Liver Disease**, v. 45, n. 12, p. 978–985, 2013.

Peña, A. S. Contribution of genetics to a new vision in the understanding of inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 30, p. 4784–4787, 2006.

Peyrin-Biroulet, L.; Loftus E. V.; Colombel J. F.; Sandborn W. J. The natural history of adult Crohn's disease in population-based cohorts. **American Journal of Gastroenterology**, v. 105, n. 2, p. 289–297, 2010.

Radford-Smith, G.; Pandeya, N. Associations between NOD2 / CARD15 genotype and phenotype in Crohn ' s disease-Are we there yet ? **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 44, p. 7097–7103, 2006.

Ramos-Vara, J. A. Technical Aspects of Immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 4, p. 405–426, 2005.

Roda, A., Seidel, M., Niessner, R. **Chemiluminescence and Bioluminescence: Past, Present and Future**. 1. ed. 2010. 289-333 p. ISBN 978-1-84973-202-4

Rogler, G. et al. Concept for a rapid point-of-care calprotectin diagnostic test for diagnosis and disease activity monitoring in patients with inflammatory bowel disease: expert clinical opinion. **Journal of Crohn's & colitis**, v. 7, n. 8, p. 670–677, 2013.

Rogler, G. Chronic ulcerative colitis and colorectal cancer. **Cancer Letters**, v. 345, n. 2, p. 235–241, 2014.

Rosenberg, L. et al. Histologic markers of inflammation in patients with ulcerative colitis in clinical remission. **American Gastroenterological Association**, v. 11, n. 8, p. 991–996, 2013.

Roszak, D. et al. Determination of faecal inflammatory marker concentration as a noninvasive method of evaluation of pathological activity in children with inflammatory bowel diseases. **Advances in Medical Sciences**, v. 60, n. 2, p. 246–252, 2015.

Rubin, D. T. et al. Inflammation is an independent risk factor for colonic neoplasia in patients with ulcerative colitis: A case-control study. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 12, p. 1601–1608, 2013.

Sachar, D. B.; Walfish, A. Inflammatory bowel disease: one or two diseases? **Current gastroenterology reports**, v. 15, n. 1, p. 298, 2013.

Sandborn, W. J. Oral 5-ASA therapy in ulcerative colitis: what are the implications of the new formulations? **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 42, n. 4, p. 338–344, 2008.

Sartor, R. B. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. **Nature clinical practice. Gastroenterology & hepatology**, v. 3, n. 7, p. 390–407, 2006.

Shih, D. Q.; Targan, S. R. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 14, n. 3, p. 390–400, 2008.

Smith, L. A.; Gaya, D. R. Utility of faecal calprotectin analysis in adult inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 46, p. 6782–6789, 2012.

Souza, M. M.; Barbosa, D. A.; Espinosa, M. M.; Belasco, A. G. S. Quality of life in the patients with inflammatory bowel disease. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 24, n. 4, p. 479–484, 2011.

Souza, M. M. de; Belasco, A. G. S.; Aguilar-Nascimento, J. E. de. Perfil epidemiológico dos pacientes portadores de doença inflamatória intestinal do estado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 28, n. 3, p. 5–9, 2008.

Spooren, C. E. G. M. et al. Review article: the association of diet with onset and relapse in patients with inflammatory bowel disease. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 38, n. 10, p. 1172–87, 2013.

Stange, E. F. et al. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. **Gut**, v. 55, n. 1, p. 1–15, 2006.

Strober, W.; Fuss, I.; Mannon, P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 3, p. 514–521, 2007.

Sydora, M. J.; Sydora, B. C.; Fedorak, R. N. Validation of a point-of-care desk top device to quantitate fecal calprotectin and distinguish inflammatory bowel disease from irritable bowel syndrome. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 6, n. 2, p. 207–214, 2012.

Szigethy, E.; McLafferty, L.; Goyal, A. Inflammatory bowel disease. **Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America**, v. 19, n. 2, p. 301–318, 2010.

Torlakovic, E. E., Riddell, R., Banerjee, D., et al. Canadian Association of Pathologists Association Best Practice Recommendations for Standardization of Immunohistochemistry Tests. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 133, n. 3, p. 354–365, 2010.

Vermeire, S.; Van Assche, G.; Rutgeerts, P. Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? **Gut**, v. 55, p. 426–431, 2006.

Voganatsi, A. et al. Mechanism of extracellular release of human neutrophil calprotectin complex. **Journal of leukocyte biology**, v. 70, n. 1, p. 130–134, 2001.

Walsh, A. J. et al. Comparing disease activity indices in ulcerative colitis. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 8, n. 4, p. 318–325, 2014.

Weeks, I. et al. Acridinium esters as high-specific-activity labels in immunoassay. **Clinical Chemistry**, v. 29, n. 8, p. 1474–1479, 1983.

Wu, G. D. et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. **Science**, v. 334, n. 10, p. 105–108, 2011.

Yantiss, R. K., Odze, R. D. Diagnostic difficulties in inflammatory bowel disease pathology. **Histopathology**, v. 48, n. 2, p. 116–132, 2006.

ANEXOS

ANEXO 1

Comitê de Ética em Pesquisa



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº. 316/2010 - CEP/CCS

Recife, 19 de novembro de 2010

Registro do SISNEP FR – 349673

CAAE – 0223.0.172.000-10

Registro CEP/CCS/UFPE Nº 222/10

Título: **Análise do polimorfismo gênico em diferentes formas anátomo-clínicas da Doença de Crohn.**

Pesquisador Responsável: Wagner Neves Fernandes

Senhor(a) Pesquisador(a):

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epigrafe, liberando-o para início da coleta de dados em 18 de novembro 2010.

Ressaltamos que a aprovação definitiva do projeto será dada após a entrega do relatório final, conforme as seguintes orientações:

- a) Projetos com, no máximo, 06 (seis) meses para conclusão: o pesquisador deverá enviar apenas um relatório final;
- b) Projetos com períodos maiores de 06 (seis) meses: o pesquisador deverá enviar relatórios semestrais.

Dessa forma, o ofício de aprovação somente será entregue após a análise do relatório final.

Atenciosamente

Prof. Gerardo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/CCS / UFPE

Ao
Mestrando Wagner Neves Fernandes
Pós-Graduação em Patologia – CCS/UFPE

ANEXO 2

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Prezado(a) paciente,

Chamo-me **Ana Paula Fernandes da Silva**, sou aluna regularmente matriculada no mestrado do **Programa de Pós-graduação em Patologia (POSPAT)** do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CCS-UFPE) e pretendo realizar uma pesquisa, sob a orientação dos Professores Mario Ribeiro de Melo Júnior com o objetivo de realizar um levantamento de pacientes portadores da Doença de Crohn ou retocolite ulcerativa atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE) e Hospital Barão de Lucena SES/PE.

Para tanto, há necessidade de utilizarmos amostras teciduais a fim de realizar estudos laboratoriais cruciais para o entendimento de diferentes proteínas envolvidas na patogênese destas doenças.

Vossa participação nesta pesquisa consistirá em autorizar a coleta de amostras de teciduais através de biópsia durante seus exames de rotina referente ao seu tratamento sob responsabilidade deste serviço médico.

As informações obtidas por meio desta pesquisa serão publicadas em meio acadêmico-científico e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar a identificação do paciente.

A nossa população se beneficiará desta pesquisa, pelo fato dos esclarecimentos que vamos trazer por se tratar de um assunto controverso e carente de informações prognósticas confiáveis e com isso vamos contribuir para diminuir o sofrimento de muitos pacientes melhorando a qualidade de vida dos mesmos.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

Este projeto foi submetido e aprovado ao Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da UFPE, de acordo com a resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, sob o número 222/10.

Desde já colocamo-nos a inteira disposição para quaisquer esclarecimentos adicionais.

Atenciosamente,



Mario Ribeiro de MELO-JÚNIOR

Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n, Cidade Universitária, Recife, PE
Fone: 2126-8588. e-mail: mariormj@gmail.com

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação, e concordo, voluntariamente, em autorizar a coleta das amostras biológicas solicitadas.

Nome do paciente

ANEXO 3
Questionário Sociodemográfico

1. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO (entrevistador responsável)			
Local de coleta		Data	
Número do prontuário		ID	
2. INFORMAÇÕES PESSOAIS			
Nome			
Data de nascimento		Telefone	
Endereço atual			
Bairro		Cidade	
UF	CEP	Zona () urbana () rural	
3. SITUAÇÃO SOCIOECONÔMICA E DEMOGRÁFICA			
Etnia ☐ branca ☐ parda ☐ preta ☐ amarela ☐ indígena			
Situação conjugal ☐ solteira ☐ casada ☐ viúva ☐ divorciada			
Escolaridade ☐ nenhuma ☐ NS/Recusa ☐ fund menor incompleto ☐ fund menor completo ☐ fund maior incompleto ☐ fund maior completo ☐ médio incompleto ☐ médio completo ☐ superior incompleto ☐ superior completo			
Profissão			
Renda mensal ☐ NS/Recusa ☐ não tenho renda ☐ 1 SM ☐ 2 a 3 SM ☐ 3 a 5 SM ☐ 5 a 10 SM ☐ mais de 10 SM ☐ mais de 20 SM ☐ mais de 30 SM			
4. HISTÓRIA REPRODUTIVA			
Número de gestações? _____		Idade da primeira gestação? _____	
5. HISTÓRICO CLÍNICO			
Altura		Peso	
Com que frequência vai ao proctologista? ☐ mensal ☐ trimestral ☐ semestral ☐ anual			
Qual foi o resultado do seu último exame? ☐ DC ☐ RCU			
Está fazendo uso de algum medicamento? ☐ SIM ☐ NÃO			
Qual(is)? _____			
Já teve algum tipo de câncer? ☐ SIM ☐ NÃO			
Tipo de CA _____			
6. HISTÓRICO FAMILIAR			
Algum parente com câncer? ☐ SIM ☐ NÃO			
Grau de parentesco _____		Tipo de CA _____	
7. TABAGISMO			
Fuma? ☐ SIM ☐ NÃO ☐ PAROU DE FUMAR (há quanto tempo parou? _____)			
Há quanto tempo fuma? _____			
Quantidade de cigarros por dia? ☐ 1 a 3 ☐ 4 a 6 ☐ 7 a 10 ☐ maço			
8. HISTÓRICO ALIMENTAR			
Consome bebidas alcoólicas? ☐ SIM ☐ NÃO			
Com que frequência costuma beber? ☐ diariamente ☐ semanalmente ☐ mensalmente ☐ raramente			
9. ATIVIDADE FÍSICA			
Pratica alguma atividade física por pelo menos 10 minutos seguidos? ☐ SIM ☐ NÃO			
Com que frequência? _____ dias da semana			

ANEXO 4

Atividades desenvolvidas durante o Mestrado
(2015-2016)

Produção Científica (Resumos):

1. GRANJA, L.M.; **SILVA, A.P.F.**; MELLO, L.A.; SILVA, A.F.V.P.; SILVA-JUNIOR, J.C.L.. **Marcadores Prognósticos para o Câncer Colorretal em Pacientes com Retocolite Ulcerativa.** In: VI Simpósio Nacional de Biomedicina, 2015, Recife.
2. TENORIO, P.P.; ARAÚJO, M.M.; **SILVA, A.P.F.**; PONTES-FILHO, N.T.; PAIVA, M.S.; MELO-JUNIOR, M.R.. **Evaluation and Molecular Characterization of FBN1 and TGFBR2 genes in atherosclerotic lesions and Aortic Aneurysms in Human.** Experimental Pathology and Health Sciences, v. 8, p. 23-24, 2016.
3. SILVA, R.B.C.; **SILVA, A.P.F.**; OLIVEIRA-FILHO, J.S.; PONTES-FILHO, N.T.; MELO-JUNIOR, M.R.. **Alternative method for nucleic acids obtained from parafinized prostatic tissues.** Experimental Pathology and Health Sciences, v. 8, p. 9-10, 2016.
4. **SILVA, A.P.F.**; MELO-JUNIOR, M.R.. **Biomarcadores fecais úteis nas doenças inflamatórias intestinais: revisão sistemática.** Arquivos de Ciências da Saúde (FAMERP), v. 23, p. 16-20, 2016.
5. **SILVA, A.P.F.**; MELLO, L.A.; SANTOS, E.R.R.; PAZ, S.T.; CAVALCANTI, C.L.B.; MELO-JUNIOR, M.R.. **Histopathological and Digital Morphometrical Evaluation of Uterine Leiomyoma in Brazilian Women.** Obstetrics and Gynecology International, v. 2016, p. 1-5, 2016.
6. MELLO, L.A.; OLIVEIRA-FILHO, J.S.; **SILVA, A.P.F.**; MACHADO, M.C.F.P.; MELO-JUNIOR, M.R.. **POS-PVA (polysiloxane-polyvinyl alcohol) discs: a new compatible polymer for immobilization of immunologic biomolecules.** Experimental Pathology and Health Sciences, v. 8, p. 41-42, 2016.
7. **SILVA, A. P. F.**; NASCIMENTO, G. A. F.; MELLO, L. A.; SOUTO-MAIOR, M. R. M.; PAZ, S. T.; MELO-JUNIOR, M. R. Histopathological analysis of crypt changes in inflammatory bowel disease. VI Congresso Luso-brasileiro de Patologia Experimental (2016), Hotel Sesc em Garanhuns, Pernambuco, Brasil.
8. **SILVA, A. P. F.**; NASCIMENTO, G. A. F.; MELLO, L. A.; LIMA, I. T.; SOUTO-MAIOR, M. R. M.; MELO-JUNIOR, M. R. Imunohistochemical of calprotectin in anorectal tissues from patients with inflammatory bowel disease. VI Congresso Luso-brasileiro de Patologia Experimental (2016), Hotel Sesc em Garanhuns, Pernambuco, Brasil.
9. NASCIMENTO, G. A. F.; **SILVA, A. P. F.**; LIMA, L. R. A.; AIRES, A. L.; MELO-JUNIOR, M. R.; CARVALHO JÚNIOR, L. B. Digital morphometric analyses of collagen fibers in granulomas on liver from mice infected by *Schistosoma mansoni*. VI Congresso Luso-brasileiro de Patologia Experimental (2016), Hotel Sesc em Garanhuns, Pernambuco, Brasil

Estágio em Docência:

DISCIPLINA: PA210 – PROCESSOS PATOLÓGICOS GERAIS

TURMA: ENFERMAGEM

RESPONSÁVEL PELA DISCIPLINA: Adriana Maria da Silva Telles

Mario Ribeiro de Melo Junior

PERÍODO DE ESTÁGIO: Março – Junho (2016)

QUANTIDADE DE AULAS: 10

QUANTIDADE DE DIAS: 15

CONTEÚDOS LECIONADOS: Distúrbios de crescimento e da diferenciação celular; Degeneração celular; Calcificações patológicas; Pigmentações patológicas; Processos inflamatórios agudos e crônicos; Reparo Tecidual (Cicatrizações); Distúrbios circulatórios e hemodinâmicos; Aspectos gerais da carcinogênese Etiopatogênica e Fisiopatologia das Neoplasias.

Cursos:

Bioinformática 60h (2016)

Programa de Educação Continuada

Portal Educação SA, Brasil.

Histologia Clínica 80h (2016)

Programa de Educação Continuada

Portal Educação SA, Brasil.

Comissão organizadora de eventos:

Evento: IV Jornada de Patologia da UFPE (2015)

Universidade Federal de Pernambuco

Carga horária: 20h

Evento: V Congresso Luso-brasileiro de Patologia Experimental (2015)

Escola Universitária Vasco da Gama

Carga horária: 25h

Projeto de Extensão:

6º Curso Atualizações em Patologia Geral

Docente no módulo: Inflamação, Imunologia e Imunopatologia

Universidade Federal de Pernambuco

Carga horária: 40h/aula

ANEXO 5

Apresentação oral no VI Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental

(a ser publicado na revista *Experimental Pathology and Health Sciences*)

IMUNOHISTOCHEMICAL OF CALPROTECTIN IN ANORECTAL TISSUES FROM PATIENTS WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

ANA PAULA FERNANDES DA SILVA¹; GABRIELA AYRES FRAGOSO NASCIMENTO²; LUCIANO DE ALBUQUERQUE MELLO³; INGRID TAVARES DE LIMA³; MARCELO DO REGO MACIEL SOUTO MAIOR¹; MARIO RIBEIRO DE MELO-JÚNIOR^{1,3}

1. Programa de Pós-graduação em Patologia, CCS/UFPE, Brazil; 2. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, CCB/UFPE, Brazil; 3. Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA/UFPE, Brazil.

Abstract

High levels of calprotectin in patients with IBD are the result of the increase in neutrophil infiltration in the tunica intestinal mucosa and transmigration into the intestinal lumen. The present study evaluated, through immunohistochemistry, the expression of calprotectin in anorectal tissue from patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. Thus, tissue slices from anorectal biopsy were submitted to immunostains for calprotectin antibody. Those results showed that, according to immunohistochemical parameters, the anorectal mucous from IBD patients exhibited diffuse tissue expression to calprotectin. The data suggest that those methods could be helpful to diagnosis and assist the therapeutic accompaniment of patients with IBD.

Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD) is defined as chronic inflammatory processes, multifactorial etiopathogenesis, that affect the gastrointestinal tract. Characterized by recurrent episodes of inflammation interspersed with periods of calm and heterogeneous disease with a variety of presentations and clinical manifestations^{1,2}.

The inflamed intestinal mucosa contains a large amount of neutrophils and fecal proteins derived from these cells, such as alpha-1-antitrypsin, calprotectin, lactoferrin, polymorphonuclear elastase, lysozyme, and other molecules that have been selected and studied as indicators of inflammation gastrointestinal tract².

High levels of calprotectin in patients with IBD are the result of the increase in neutrophil infiltration in the tunica intestinal mucosa and transmigration into the intestinal lumen².

Materials and Methods

Previously cleaned sheets received histological sections (1.5×1.5×8.0 10⁻⁴ cm). deparaffinization of the slides containing the tissue in xylene and tissue hydration in ethyl alcohol battery to distilled water. The tissue samples were cut in duplicate and then subjected to immunohistochemical to S100A8/A9 Calprotectin (monoclonal antibody to human MRP8/14 BMA Biomedicals).

Antigen retrieval was performed with 100 mM pH 6.0 citrate buffer in a pressure cooker for 2 minutes after boiling. Subsequently, the samples were cooled to 35° C and then incubated with hydrogen peroxide solution for 30 minutes at room temperature to block endogenous peroxidase. Subsequently the tissues were incubated with anti-calprotectin monoclonal antibodies (1:200) for 2 hours at 37° C in an oven.

The location of the antibody was performed using the detection system Reveal Polyvalent Free Biotin-DAB (Biogen SPD-060), it's development with DAB-H₂O₂ and counterstained with hematoxylin. All washes performed between the described steps used 100mM sodium phosphate buffer, pH 7.2 with 150 mM NaCl (PBS). For the negative control, anti-calprotectin antibody was replaced by PBS.

Results

In the immunohistochemistry study found reactivity to calprotectin (Figure 1) in anorectal tissue from patients with Crohn's disease (n = 9), ulcerative colitis (n = 20). Samples of anorectal tissues (n = 6) without anatomical changes related to IBD were used as negative control for purposes comparative.

The result showed diffuse expression of calprotectin for Crohn's disease and ulcerative colitis. While the samples of negative control were not found significant imunoexpression.

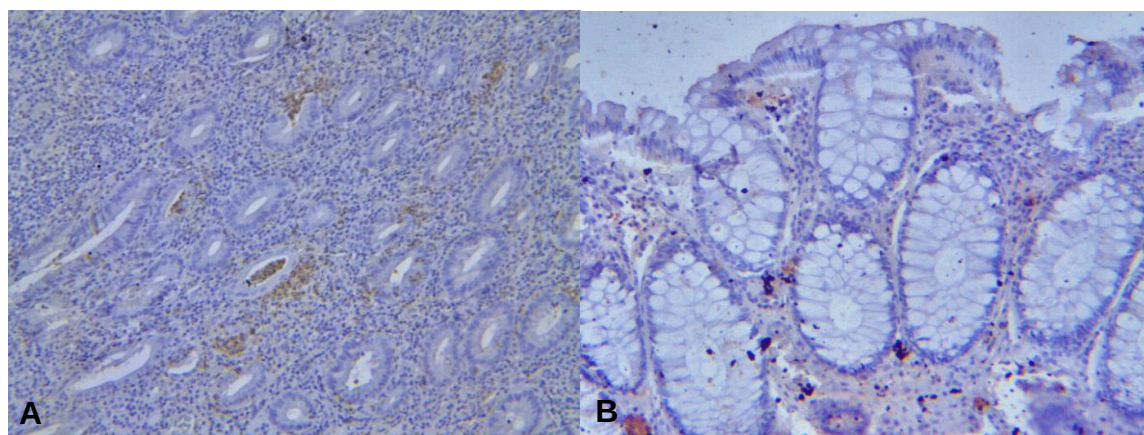


Figure 1. In **A** the tissue expression of calprotectin in patients with Crohn's disease (Magnification 100x). In **B** note the imunoexpression in patients with ulcerative colitis (Magnification 100x).

Discussion and Conclusion

Calprotectin is a calcium binding protein and zinc S-100 family formed by S100A8 and S100A9 subunits. Because it is a widely expressed protein in neutrophils, it relates very well with the histopathologic analysis because it reflects the leukocyte migration conditions enabling therefore the assessment of the degree and type of inflammation. In infectious processes the plasma levels of calprotectin is significantly increased and can be detected in urine, saliva, plasma, cerebrospinal fluid and biopsies. There is a significant correlation between calprotectin excretion and the severity of inflammation, extent and combination of both^{3,4}.

The concentration of calprotectin in healthy adults has been well established in various studies demonstrating a median serum concentrations around 25 mg/kg. Being, values above 50 mg/kg considered abnormal. In patients with active IBD, studies have shown values ranging from 200 mg/kg to 1,000 mg/kg, these findings support the hypothesis that the increase in calprotectin is a result of migration of neutrophils in inflamed mucosa to the intestinal lumen^{5,6}.

In conclusion, in the absence of pathognomonic symptoms for the diagnosis of IBD which allows the differentiation with the Crohn's disease and ulcerative colitis, other forms of enterocolitis, and irritable bowel syndrome, it has been increasingly growing interest in diagnostic methods that

provide techniques with higher sensitivity and specificity, enabling the quantification of the severity and extent of the lesions. In this context, immunohistochemistry of tissue biopsies and different types of enzymatic or chemiluminescent immunoassays with calprotectin could be helpful to diagnosis and assist the therapeutic accompaniment of patients with IBD.

References

1. Abraham, B. P.; Kane, S. Fecal Markers: Calprotectin and Lactoferrin. *Gastroenterology Clinics of North America*. 2012;41(2);483-495.
2. Silva, A. P. F.; Melo-Junior, M. R. Biomarcadores fecais úteis nas doenças inflamatórias intestinais: revisão sistemática. *Arquivos de Ciências da Saúde*. 2016 :23(1);16-20.
3. Erbayrak, M. et al. The role of fecal calprotectin in investigating inflammatory bowel diseases. *Clinics*. 2009;64(5);421-425.
4. Smith, L. A.; Gaya, D. R. Utility of faecal calprotectin analysis in adult inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*. 2012;18;6782-6789.
5. Cury, D. B. et al. Serum calprotectin levels correlate with biochemical and histological markers of disease activity in TNBS colitis. *Cellular Immunology*. 2013;282(1);66-70.
6. Rogler, G. et al. Concept for a rapid point-of-care calprotectin diagnostic test for diagnosis and disease activity monitoring in patients with inflammatory bowel disease: expert clinical opinion. *Journal of Crohn's & colitis*. 2013;7(8);670-677.