

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA
CRIANÇA E DO ADOLESCENTE**

Michela Cynthia da Rocha Marmo

**Dos aspectos clínicos às características genéticas: Avaliação
de crianças e adolescentes com doenças inflamatórias
intestinais**

**Recife, PE
2017**

Michela Cynthia da Rocha Marmo

**Dos aspectos clínicos às características genéticas: avaliação
de crianças e adolescentes com doenças inflamatórias
intestinais**

Tese de dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente.

Orientadora: Profa. Dra. Gisélia Alves Pontes da Silva

Coorientadora: Profa. Dra. Kátia Galeão Brandt

Área de Concentração: Abordagens Quantitativas em Saúde

Linha de Pesquisa: Avaliação bioquímica, molecular, sensório-motora e nutricional das doenças gastrointestinais orgânicas e funcionais.

Recife, PE

2017

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa - CRB4-1010

M351d Marmo, Michela Cynthia da Rocha.
Dos aspectos clínicos às características genéticas: avaliação de crianças e adolescentes com doenças inflamatórias intestinais / Michela Cynthia da Rocha Marmo. – 2017.
201 f.: il.; tab.; quad.; gráf.; 30 cm.

Orientadora: Gisélia Alves Pontes da Silva.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente. Recife, 2017.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Doença de Crohn. 2. Retocolite ulcerativa. 3. Citocinas. 4. Polimorfismos genéticos. 5. Crianças. I. Silva, Gisélia Alves Pontes da (Orientadora). II. Título.

618.92

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2017-332)

Michela Cynthia da Rocha Marmo

**Dos aspectos clínicos às características genéticas: avaliação de
crianças e adolescentes com doenças inflamatórias intestinais**

Tese de dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente.

Aprovado em: 20 / 06 / 2017.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Gisélia Alves Ponte da Silva (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Profa. Dra. Maria das Graças Moura Lins (Examinadora externa)
Hospital das Clínicas – UFPE

Profa. Dra. Margarida Maria de Castro Antunes (Examinadora interna)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Profa. Dra. Mariana Montenegro de Melo Lira (Examinadora externa)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof. Dr. Carlos Alexandre Antunes de Brito (Examinador externo)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Recife, PE
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof^a. Dr^a. Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Ernani Rodrigues Carvalho Neto

DIRETOR CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETORA

Profa. Dra. Vânia Pinheiro Ramos

COORDENADORA DA COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO DO CCS

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

COLEGIADO

CORPO DOCENTE PERMANENTE

Profa. Dra. Luciane Soares de Lima (Coordenadora)
Profa. Dra. Claudia Marina Tavares de Araújo (Vice-Cordenadora)
Prof. Dr. Alcides da Silva Diniz
Profa. Dra. Ana Bernarda Ludermir
Profa. Dra. Andréa Lemos Bezerra de Oliveira
Prof. Dr. Décio Medeiros Peixoto
Prof. Dr. Emanuel Savio Cavalcanti Sarinho
Profa. Dra. Estela Maria Leite Meirelles Monteiro
Profa. Dra. Gisélia Alves Pontes da Silva
Prof. Dr. José Ângelo Rizzo
Profa. Dra. Maria Gorete Lucena de Vasconcelos
Profa. Dra. Marília de Carvalho Lima
Prof. Dr. Paulo Sávio Angeiras de Góes
Prof. Dr. Pedro Israel Cabral de Lira
Profa. Dra. Poliana Coelho Cabral
Profa. Dra. Sílvia Wanick Sarinho
Profa. Dra. Sophie Helena Eickmann
(Mayra Ruana de Alencar Gomes - Representante discente - Doutorado)
(Amanda Araújo das Mercês - Representante discente -Mestrado)

CORPO DOCENTE COLABORADOR

Profa. Dra. Bianca Arruda Manchester de Queiroga
Profa. Dra. Cleide Maria Pontes
Profa. Dra. Daniela Tavares Gontijo
Profa. Dra. Kátia Galeão Brandt
Profa. Dra. Margarida Maria de Castro Antunes
Profa. Dra. Maria Wanderleya de Lavor Coriolano Marinus
Profa. Dra. Rosalie Barreto Belian
Profa. Dra. Silvia Regina Jamelli

SECRETARIA

Paulo Sergio Oliveira do Nascimento (Secretário)
Juliene Gomes Brasileiro
Nilan Rodrigues da Silva Costa

Aos meus pais Antoninho e Marinete, sempre eles.

Aos meus avós que superaram seus limites pelos filhos e netos.

*Aos meus pequenos pacientes que enfrentam desafios da vida sem
perder a graciosidade.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Gisélia Alves pelos seus ensinamentos, sua gentileza, seu cuidado e sua generosidade. O seu incentivo e apoio foi fundamental em todo este processo. Orgulho de tê-la como minha professora desde o período da graduação em Medicina, de fato, a professora que sempre foi uma inspiração para mim.

À minha coorientadora Profa. Dra. Kátia Brandt por me estimular e me acompanhar nesta jornada, ensinando e ajudando, com uma dedicação sem igual. Para mim é a professora que sempre tem algo a ensinar e a amiga que sempre está por perto.

Aos meus pais, Antoninho e Marinete, pelo apoio e amor incondicional em todos os momentos, de alegria ou de tristeza, de sucesso ou de dificuldades. Sem eles seria impossível chegar a este momento. Agradeço a eles por quem eu sou e quem ainda eu posso ser.

À minha irmã, Marcela, sempre companheira, que está presente em todos os desafios que decido superar. O apoio “técnico” de todas as horas, imprescindível nesta tese.

Ao meu Padrinho, José Inaldo, que me ensina a cada dia o amor pelo seu trabalho. Um exemplo que sempre vou admirar e seguir.

Aos pacientes e seus familiares que gentilmente me ajudaram e colaboraram com a tese, acreditando junto comigo que de alguma forma este estudo ajudaria as crianças com doença inflamatória intestinal.

À gastroenterologia pediátrica do IMIP, representadas pelas médicas Manuela, Mara, Georgia e Paloma e à turma de residentes – Priscila, Stella, Ana Luiza, Najara, Carolina, Tatiana, Renata, Jessika e Camila - que nestes quatro anos acompanharam e ajudaram de alguma maneira na realização desta tese. Obrigada pela compreensão nos períodos da minha ausência, pela ajuda com a pesquisa e pela dedicação ao grupo e aos pacientes.

Em especial, às médicas gastroenterologistas Paloma Velez e Mara Alves pela contribuição com a análise histopatológica e estatística, respectivamente, sendo colaborações de grande importância na elaboração desta tese.

Às gastroenterologistas pediátricas, Margarida Antunes e Graça Moura pela ajuda e apoio durante o período do doutorado e principalmente pelo suporte nos momentos finais de elaboração desta tese.

Ao grupo da Gastroenterologia Pediátrica de Recife com a sua reconhecida generosidade que me inspira e estimula, sendo que pertencer a este grupo é um dos motivos de orgulho da minha escolha profissional.

Ao grupo de pesquisa do LIKA, liderados pelo Prof. Dr. José Luis. Meus agradecimentos especiais aos pesquisadores Taciana Salviano e Fabrício Souto, pela fundamental participação nas análises moleculares do estudo e pelos ensinamentos durante todo o processo de pesquisa. E, sim, pela amizade cultivada nestes quatro anos, que levarei para a vida toda.

À técnica de enfermagem do IMIP Claudia, a Claudinha, pela sua contribuição inestimável na coleta dos exames e pela alegria e dedicação diária com os nossos pacientes e com o serviço de gastropediatria.

À coordenadora do setor de Pesquisa do IMIP, Leuridan Torres, pelo apoio em momentos importantes e pelos preciosos ensinamentos em imunologia.

À Profa. Dra. Magda Carneiro-Sampaio por tornar possível a realização da análise de DNA em seu serviço, o Instituto da Criança – USP e pelo incentivo desde a ideia inicial que resultou nesta tese.

À pesquisadora Andréia Rangel Santos por realizar todas as análises de DNA dos pacientes do estudo e estar sempre disponível para ajudar com a pesquisa.

Ao Prof. Dr. Frank Ruemmele pelos valiosos ensinamentos sobre doença inflamatória intestinal em crianças que muito contribuiu para realização desta pesquisa.

Ao médico endoscopista Gustavo Carneiro Leão pelo suporte no diagnóstico e tratamento dos pacientes acompanhados no serviço de gastroenterologia do IMIP, seu trabalho e cuidados com nossos pacientes são muito estimados pelo grupo e foram de grande contribuição para este estudo.

A médica patologista Adriana Santos pela análise histológica das biópsias dos pacientes da pesquisa já fruto de um trabalho de parceria desde o início do serviço de gastroenterologia pediátrica do IMIP.

Aos funcionários da secretaria da Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, representados aqui por Paulo, Juliene e Érica.

Aos professores da Pós-graduação em saúde da criança e do adolescente. Especialmente às professoras Marília Lima, Claudia Marina e Luciane pela dedicação e ensinamentos no período do doutorado.

Às amigas Izabel, Maria Emília e Paula que em todos esses anos de amizade participaram de todos os momentos e desafios que passei, sempre presentes e, cada uma à sua maneira, me ajudando e aconselhando. Agradeço também às suas famílias que hoje são a minha família também.

E com muito carinho e saudade, agradeço às amigas e companheiras da turma de doutorado 08 - Ana Paula, Fabiane, Leila e Valeska. Obrigada por tornarem este período mais leve e feliz, vocês foram um grande presente desta jornada.

Estudar as doenças sem livros é navegar em mar largo sem bússola; mas estudar nos livros sem ver doentes é ficar ancorado no porto.

William Osler Aequanimitas, 1906

RESUMO

Introdução: o processo inflamatório nas Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) é resultante de uma desordem na modulação do sistema imunológico intestinal envolvendo diferentes fatores entre os quais os polimorfismos genéticos, o ambiente e a microbiota intestinal. Diante da diversidade de fenótipos da doença e os mecanismos patogênicos envolvidos, torna-se um desafio interpretar os achados clínicos e os exames complementares. **Objetivos:** descrever o perfil clínico das crianças e adolescentes com diagnóstico de DII atendidas no Serviço de Gastroenterologia Pediátrica do IMIP; avaliar o *status* inflamatório dos pacientes a partir de biomarcadores sanguíneos, macro e microscópicos e moleculares; verificar a presença de polimorfismos genéticos associados à DII descritos na literatura. **Métodos:** foi realizado um estudo do tipo Série de Casos com crianças e adolescentes portadoras de Doença de Crohn (DC) e Retocolite Ulcerativa (RU). Dados demográficos, clínicos e antropométricos foram obtidos através de entrevistas com os responsáveis, revisão de prontuários e exames clínicos. A atividade inflamatória foi realizada através de exames laboratoriais, endoscópico, histopatológico e molecular. Avaliou-se a presença de polimorfismos genéticos associados a DII do NOD2, IL10, IL10RA e IL10RB e a expressão do RNA destes genes na mucosa intestinal. **Resultados:** dos 66 pacientes incluídos no estudo, 37,9% tinham o diagnóstico de DC e 62,1% de RU, sendo 56% e 19,5% dos casos de DC e RU em menores de dois anos (Infantil). Quando avaliados pelos índices de atividade inflamatória (PUCAI para RU e PCDAI para DC), encontrou-se 65,1% (43/66) dos pacientes em remissão da DII. Dos pacientes com DC Infantil constatou-se a presença de fístulas e/ou estenoses em 71,4% dos casos. Os pacientes com DC apresentaram sintomas (Mediana de 12 meses) e tiveram o diagnóstico firmado (Mediana de 60 meses) mais precoce. Nos pacientes estudados, a diarreia foi o sintoma mais frequente. A concomitância de atividade inflamatória clínica/atividade inflamatória laboratorial e de atividade inflamatória clínica/atividade inflamatória histológica foi 83,3% na DC e 77,8% na RU. A presença de atividade inflamatória clínica associada ao aumento de PCR e/ou VHS foi de 83,3% na DC e de 66,7% na RU. O perfil de citocinas apresentado pelos pacientes, que tinham diferentes fenótipos clínicos, tempo de doença e esquemas terapêuticos foi variável e não caracterizou um padrão. Em 35 pacientes foram identificados polimorfismos para os genes da IL10, dos receptores da IL10 (IL10RA e IL10R) e do NOD2. **Conclusões:** o fenótipo compatível com RU predominou neste estudo. A DII infantil, de início antes de dois anos de idade, foi parte importante da casuística. Os casos de DC tiveram evolução mais agressiva. A avaliação da atividade inflamatória através dos dados clínicos, laboratoriais e endoscópicos mostrou coerência. A avaliação molecular, pela sua diversidade, é de difícil interpretação e não nos pareceu colaborar para refinar a avaliação tradicional. Os pacientes apresentaram diversos polimorfismos genéticos, mas essa avaliação não parece contribuir para o diagnóstico ou nortear a terapia.

Palavras chave: Doença de Crohn. Retocolite ulcerativa. Citocinas. Polimorfismos genéticos. Crianças.

ABSTRACT

Introduction: The inflammatory process in Inflammatory Bowel Diseases (IBD) is a result of a disorder in the modulation of the intestinal immune system involving different factors including genetic polymorphisms, environment and intestinal microbiota. Given the phenotypic diversity of disease and the pathogenic mechanisms involved, it is challenging to interpret the clinical findings and the complementary tests. **Objectives:** to describe the clinical aspects of children and adolescents diagnosed with IBD treated at the Pediatric Gastroenterology Service of IMIP; To evaluate the inflammatory status of patients from blood, endoscopic, microscopic and molecular biomarkers; To verify the presence of genetic polymorphisms associated with IBD is found in the literature. **Methods:** A Case-Serial Study was carried out with children and adolescents with Crohn's Disease (DC) and Ulcerative Colitis (UF). Demographic, clinical and anthropometric data were obtained through interviews with parents, review of medical records and clinical exams. The inflammatory activity was performed through laboratory, endoscopic, histopathological and molecular examinations. If a presence of DII-associated genetic polymorphisms of NOD2, IL10, IL10RA and IL10RB is an RNA expression of these genes in the intestinal mucosa. **Results:** Of the 66 patients included in the study, 37.9% had a diagnosis of CD and 62.1% of RU, being 56% and 19.5% of cases of CD and UR in children younger than two years. Regarding inflammatory activity indexes (PUCAI for RU and PDAI for CD), 65.1% (43/66) of the patients in remission of IBD were found. Of the patients with Childhood DC there was a presence of fistulas and / or stenoses in 71.4% of the cases. Patients with CD presented symptoms (Median 12 months) and had a clinical diagnosis (Median 60 months) earlier. In the patients studied, diarrhea was the most frequent symptom. The concomitance of inflammatory clinical activity / laboratory inflammatory activity and of inflammatory clinical activity / histological inflammatory activity was 83.3% in DC and 77.8% in UR. The presence of clinical inflammatory activity associated with increased CRP and / or HSV was 83.3% in CD and 66.7% in RU. The cytokine profile of patients, who have different clinical phenomena, disease time and therapeutic schemes for variable and do not characterize a pattern. In 35 patients, polymorphisms were identified for IL10 genes, IL10 receptors (IL10RA and IL10R) and NOD2. **Conclusions:** the RU compatible phenotype predominated in this study. Infant IBD, before the age of two years, was an important part of the series. The cases of CD had a more aggressive evolution. An assessment of inflammatory activity through clinical, laboratory, and endoscopic data showed consistency. A molecular evaluation, because of its diversity, is difficult to interpret and did not seem to collaborate to refine a traditional assessment. Patients have several genetic polymorphisms effects, but this evaluation does not appear to contribute to the diagnosis or treatment.

Keywords: Crohn disease. Ulcerative colitis. Cytokines. Genetic polymorphisms. Children.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	–	Incidência da DII no mundo	27
Figura 2	–	Incidência e prevalência da RU no mundo	28
Figura 3	–	Incidência e prevalência da DC no mundo	28
Figura 4	–	Representação da mucosa intestinal e do SII e do SIA	36
Figura 5	–	A via da autofagia	41
Figura 6	–	Exemplo da interação entre a imunidade inata, imunidade adaptativa e microbiota no paciente normal e no paciente com DC	42
Figura 7	–	Ações da IL6	45
Figura 8	–	Mecanismo de sinalização da IL10	47

LISTA DE FLUXOGRAMA

Fluxograma 1	–	Fluxograma de pesquisa	63
--------------	---	------------------------	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	– Evolução de pIMC de pacientes com DC precoce	80
Gráfico 2	– Evolução de pIMC de pacientes com DC tardia	80
Gráfico 3	– Evolução de pIMC de pacientes com RU precoce.	80
Gráfico 4	– Evolução de pIMC de pacientes com RU tardia.	80
Gráfico 5	– IMC de acordo com percentis do paciente EAS (DC precoce) desde o diagnóstico até o momento do estudo	81
Gráfico 6	– IMC de acordo com percentis do paciente GHS (DC tardia) do diagnóstico até o momento do estudo	82
Gráfico 7	– IMC de acordo com percentis do paciente MSR do diagnóstico até o momento do estudo.	83

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	– Classificação de Paris para DC	32
Quadro 2	– Classificação de Paris para RU	33
Quadro 3	– Estudos genéticos que associam o gene NOD2 à DII e seus fenótipos	40
Quadro 4	– Polimorfismos pesquisados e sua descrição	67
Quadro 5	– Atividade inflamatória clínica, laboratorial, endoscópica e histopatológica e a expressão em tecido de TNF α , IL6 e IL10 de pacientes com DC.	88
Quadro 6	– Atividade inflamatória clínica, laboratorial, endoscópica e histopatológica e a expressão em tecido de TNF α , IL6 e IL10 de pacientes com RU.	91
Quadro 7	– Pacientes com DC avaliados quanto à presença de polimorfismos genéticos da IL10 e seus receptores e o NOD2, os fenótipos apresentados, os fenótipos esperados e a expressão de IL10 e de seus receptores e do NOD2.	96
Quadro 8	– Pacientes com RU avaliados quanto à presença de polimorfismos genéticos da IL10 e seus receptores e o NOD2, os fenótipos apresentados, os fenótipos esperados e a expressão de IL10 e de seus receptores e do NOD2	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Características de 66 crianças com diagnóstico de doença inflamatória intestinal, de acordo com os subgrupos etários.	74
Tabela 2	– Descrição dos sintomas iniciais de 66 crianças e adolescentes com doença inflamatória intestinal.	77
Tabela 3	– Estado nutricional de 58 crianças de acordo com o IMC no momento do diagnóstico de doença inflamatória intestinal	79
Tabela 4	– Atividade inflamatória de acordo com a presença de alterações clínicas em 36 crianças com doença inflamatória intestinal.	84
Tabela 5	– Atividade inflamatória laboratorial (PCR e VHS), atividade inflamatória endoscópica e atividade histológica em relação à presença ou ausência de sintomas (clínica).	86
Tabela 6	– Atividade inflamatória laboratorial (PCR e VHS) em relação à presença ou ausência de sintomas (clínica).	87
Tabela 7	– Pacientes com DC e RU precoce e tardia e distribuição dos polimorfismos apresentados.	93
Tabela 8	– Presença de doença perianal e doença fistulizante em pacientes com polimorfismos de IL10, IL10RA, IL10RB e NOD2.	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPs	– <i>antimicrobial peptide</i>
ATG	– <i>autophagy related protein</i>
CAAD	– Comissão de Avaliação e Acompanhamento Docente
CDEIS	– <i>Crohn's Disease Index of Severity</i>
CDH1	– <i>Cadherin 1</i>
CEP	– Comitê de Ética em Pesquisa
CI	– Colite indeterminada
DC	– Doença de Crohn
d.C.	– Depois de Cristo
DII	– Doença inflamatória intestinal
EDTA	– <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ESPGHAN	– <i>European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition</i>
GALT	– <i>Gut associated lymphoid Tissue</i>
GNA 12	– <i>G protein subunit alpha 12</i>
GTAID	– (Groupe d'Etudes Thérapeutiques des Affections Inflammatoires du Tube Digestif) Grupo de Estudos Terapêuticos das Doenças Inflamatórias do Tubo Digestivo
HFN4A	– <i>Hepatocyte nuclear factor 4 alpha</i>
IgA	– imunoglobulina A
IL	– interleucina
L10RA	– Receptor da interleucina 10 subunidade alfa
IL10RB	– Receptor da interleucina 10 subunidade beta

IMC	– Índice de Massa Corporal
IMIP	– Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira
INF α	– Interferon alpha
IFN γ	– Interferon gamma
JAK1	– <i>Janus kinase 1</i>
LAMB1	– <i>Laminin subunit beta 1</i>
LIGHT	– <i>homologous to Lymphotoxin exhibits Inducible expression and competes with HSV Glycoprotein D for binding to Hepervirus entry mediator, a receptor expressed on T lymphocytes</i>
Lika	– Laboratório de Imunopatologia Prof. Keizo Asami
MAIT	– <i>Mucosal associated invariant T cell</i>
NASPGHAN	– <i>North American Society of Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition</i>
NF-k β	– <i>Kappa light chain enhancer of activated β cells</i>
NLR	– <i>NOD like receptor</i>
NOD	– <i>Nucleotide binding oligomerization domain</i>
NOD2	– <i>Nucleotide binding oligomerization domain 2</i>
PAMPs	– Padrões Moleculares Associados à Patologia
pIMC	– percentil do Índice de Massa Corporal
PUCAI	– <i>Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index</i>
PCDAI	– <i>Pediatric Crohn Disease Activity Index</i>
PCR	– Proteína C-reativa
RNM	– Ressonância nuclear magnética
RRP	– Receptores de reconhecimento padrão
RU	– Retocolite ulcerativa
SES-CD	– <i>Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease</i>

SIA	– Sistema imune adaptativo
SII	– Sistema imune inato
STAT3	– Ativador do sinal da transcriptase 3
TC	– Tomografia computadorizada
TCLE	– Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF β	– <i>Transforming growth factor beta</i>
TNF α	– <i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TNFSF14	– <i>Tumor Necrosis Factor Super Family 14</i>
TRL	– <i>Toll like receptor</i>
Tyk2	– Tirosina quinase 2
UFPE	– Universidade Federal de Pernambuco
Unifesp	– Universidade Federal de São Paulo
USP	– Universidade de São Paulo
VHS	– Velocidade de hemossedimentação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1	Introdução	26
2.1.1	As características fenotípicas da DII e as particularidades da DII no paciente pediátrico	30
2.2	A inflamação na DII	34
2.2.1	Aspectos gerais da resposta inata e adaptativa da mucosa intestinal	34
2.2.2	O processo inflamatório na DII	35
2.2.2.1	O sistema imunológico inato (SII)	36
2.2.2.1.1	Os NOD like receptor	38
2.2.2.1.2	Genes associados à autofagia	39
2.2.2.2	O sistema imunológico adaptativo	41
2.2.2.2.1	Interação SII-SIA: o papel da IgA	42
2.2.2.2.2	Interação SII e SIA: o papel das citocinas	43
2.2.3	Repercussões locais e sistêmicas da inflamação	47
2.2.3.1	Avaliação clínica e por escores	49
2.2.3.2	Avaliação complementar da doença inflamatória intestinal na infância	50
2.2.3.2.1	Marcadores de fase aguda de sangue periférico	51
2.2.3.2.2	Marcadores fecais	53
2.2.3.2.3	Avaliação por imagem	54
2.2.3.2.4	Avaliação endoscópica	55
2.2.3.2.5	Avaliação histopatológica	56
2.2.3.2.6	Avaliação molecular	57
2.3	Considerações finais	58
3	MÉTODOS	59
3.1	Delineamento do estudo	59
3.1.1	Quanto à idade de aparecimento dos primeiros sintomas	59
3.1.2	Quanto ao tratamento e à resposta ao corticoesteroides	59
3.1.3	Quanto aos fenótipos clínicos da DC	60
3.1.4	Quanto ao fenótipo clínico da RU	60
3.2	Período e locais do estudo	60
3.3	Definição de termos	62
3.4	Fluxograma de pesquisa	63
3.5	Dados clínicos	64
3.6	Avaliação antropométrica	64
3.7	Avaliação da atividade inflamatória	65
3.7.1	Avaliação clínica	65
3.7.2	Avaliação laboratorial: biomarcadores	65
3.7.3	Escore de atividade inflamatória: PUCAI e PCDAI	65
3.7.4	Avaliação endoscópica	66
3.7.5	Avaliação histopatológica	66
3.7.6	Biologia molecular	66

3.8	Avaliação dos polimorfismos genéticos	67
3.8.1	Análise DNA	67
3.8.2	Expressão em tecido colônico	67
3.9	Técnicas laboratoriais e endoscópicas	68
3.9.1	Coleta e armazenamento de material	68
3.9.1.1	<i>Sangue</i>	68
3.9.1.2	<i>Tecido</i>	68
3.9.1.3	<i>Exame endoscópico</i>	68
3.9.1.4	<i>Histopatológico</i>	69
3.9.1.5	<i>Análise molecular – extração de DNA</i>	69
3.9.1.6	<i>Análise molecular – expressão em tecido colônico</i>	70
3.10	Análise estatística	70
3.11	Aspectos éticos	71
3.12	Limitações Metodológicas	72
4	RESULTADOS	73
4.1	Características gerais dos pacientes	73
4.2	Estado nutricional	78
4.2.1	Avaliação antropométrica: apresentação de casos	81
4.3	Atividade inflamatória	83
4.4	Polimorfismos genéticos	92
4.4.1	Presença de polimorfismos dos receptores da IL10RA e do RRP NOD2: apresentação de casos	92
5	DISCUSSÃO	102
5.1	Características gerais da casuística	102
5.2	Estado nutricional	107
5.3	Atividade inflamatória	111
5.4	Polimorfismos genéticos	116
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES	119
6.1	Uma reflexão sobre os achados do estudo	119
6.2	Recomendações	122
	REFERÊNCIAS	123
APÊNDICE A	– ARTIGO 1 - Doença inflamatória intestinal em crianças acompanhadas em um hospital terciário na cidade do Recife	143
APÊNDICE B	– ARTIGO 2 - Etiopatogenia da doença inflamatória intestinal na infância e adolescência	162
APÊNDICE C	– FORMULÁRIO DE PESQUISA – DADOS CLÍNICOS	185
APÊNDICE D	– CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	192

APÊNDICE E	– TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	194
APÊNDICE F	– TERMO DE ASSENTIMENTO PARA MENORES DE 8 A 18 ANOS	196
ANEXO A	– PUCAI	198
ANEXO B	– PCDAI	199
ANEXO C	– COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DO INSTITUTO DE MEDICINA INTEGRAL PROF. FERNANDO FIGUEIRA – IMIP.	200
ANEXO D	– SUBMISSÃO DO ARTIGO - Etiopatogenia da doença inflamatória intestinal na infância e adolescência – jornal de pediatria.	201

1 INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias intestinais (DII), por serem consideradas doenças raras tanto em adultos quanto em crianças, ainda são pouco diagnosticadas pelo pediatra, mesmo sabendo que 25% dos casos de DII têm início entre a infância e a adolescência. Esse fato pode ser explicado pelo desconhecimento das diferentes formas de apresentação das DII e a existência de doenças mais frequentes que podem mimetizar sua clínica e dificultar o seu diagnóstico. As gastroenterocolites infecciosas por bactérias enteroinvasivas, as colites alérgicas e a síndrome do intestino irritável são condições que, por sua frequência em crianças, são consideradas responsáveis pela sintomatologia, o que contribui para o retardo diagnóstico. Isso acarreta inúmeras consultas ao pediatra e demora no encaminhamento para o especialista.

Nas últimas décadas, muitos centros especializados vêm reportando aumento nos registros de casos de DII em crianças e adolescentes, principalmente nos países desenvolvidos. Inicialmente, imaginava-se que seria fruto de um maior reconhecimento da doença devido à maior sensibilização dos pediatras e gastroenterologistas pediátricos quanto ao diagnóstico. Todavia, já se admite um aumento real no número de casos de DII e isso já está bem documentado em países do hemisfério norte, onde essas doenças são registradas de forma sistemática e há um maior conhecimento da doença. Em países do hemisfério sul, ainda é escasso o registro de casos. Em particular, no nosso País, faltam dados epidemiológicos que nos deem uma dimensão do problema. Apenas relatos de casuísticas foram publicados.

A carência de informações contribui para que não tenhamos um perfil clínico-epidemiológico dos nossos pacientes. Dadas as diferenças genéticas e ambientais, é provável que os pacientes com DII no hemisfério sul tenham comportamento diferente em relação aos pacientes do hemisfério norte. No Brasil, ainda há poucas pesquisas relacionadas à DII pediátrica. No Recife, de maneira semelhante ao restante do País, há carência de informações e não sabemos se temos poucos casos ou se diagnosticamos pouco.

A gastroenterologia pediátrica é uma área de atuação relativamente recente em nosso estado e a implantação de serviços especializados só ocorreu nas últimas décadas. O treinamento especializado é ainda mais recente, pois só nos últimos anos foi implantada a Residência Médica em Gastroenterologia Pediátrica, inicialmente no Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP) e, posteriormente, no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Essas iniciativas têm contribuído para formação de jovens especialistas e melhorado a qualidade da assistência aos pacientes pediátricos com problemas gastroenterológicos na região.

Durante a Residência Médica em Pediatria, entrei em contato com a gastroenterologia pediátrica, o que despertou a vontade de fazer uma especialização em um serviço com tradição na área. Em 2007, após concluir o Curso de Especialização em Gastroenterologia Pediátrica na Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), iniciei minhas atividades profissionais no Ambulatório de Gastroenterologia Pediátrica do IMIP.

O meu interesse em entender e atender melhor os pacientes com DII surgiu e tem norteado o meu trabalho como médica e preceptora da residência médica em gastroenterologia pediátrica. Inicialmente, organizamos um ambulatório de DII pediátrica com o objetivo de dar a esses pacientes um atendimento melhor estruturado. Recentemente, a crescente chegada de crianças menores de 2 anos de idade com quadro clínico sugestivo de DII, quadro clínico agressivo e pouco conhecido até então, foi o estímulo para a realização de um estudo que resultou nesta tese de doutorado. Mas, ao me debruçar sobre os casos, senti a necessidade de conhecer melhor a casuística do serviço como um todo e surgiram inúmeras questões que precisavam ser respondidas: a procedência dos pacientes (zona urbana ou zona rural?); a idade de maior incidência; os casos em menores de 2 anos de idade (é realmente DII?); a forma de apresentação clínica mais frequente; o estado nutricional dessas crianças; a presença de atividade inflamatória; a existência de polimorfismos genéticos já descritos na literatura no nosso meio. Com a consolidação da especialidade de Gastroenterologia Pediátrica na cidade do Recife observamos aumento do número de pacientes, mas constatamos que muitas vezes chegavam tardiamente.

Outros serviços e grupos de estudo pelo mundo também compartilham algumas das nossas dúvidas e já sinalizavam estratégias para tentar suprir esse vácuo de informação sobre os pacientes pediátricos com DII. O grande exemplo é o crescente interesse sobre os pacientes com formas muito precoces, consideradas naqueles pacientes cujo início da doença se dá antes dos 6 anos de idade, em particular a forma infantil, cujo início da doença ocorre antes dos 2 anos de idade. Acompanhamos como muitos pesquisadores indagavam a natureza genética da doença. A associação a polimorfismos genéticos foi sendo relatada de forma cada vez mais frequente com o passar dos anos, fazendo com que surgisse nosso interesse em analisar alguns aspectos relacionados à genética.

A necessidade de conhecer melhor a casuística acompanhada em um serviço de gastroenterologia pediátrica que ainda não dispõe das facilidades tecnológicas exigidas pela medicina de precisão foi o objetivo maior da pesquisa. Daí a visão clínica perpassar todo o processo, desde o planejamento do estudo, a coleta e a interpretação dos achados. O desafio de estudar uma doença complexa, com múltiplas formas de apresentação clínica, mecanismos de doença ainda não inteiramente compreendidos, carência de biomarcadores de patogenicidade,

pacientes submetidos a diferentes tratamentos e em diferentes momentos de evolução clínica nos motivou a ir em frente.

A minha admissão no Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da UFPE como aluna do doutorado viabilizou esse projeto sob a orientação da Prof.^a Dra. Giselia Alves e coorientação da Prof.^a Dra. Katia Brandt, que teve como objetivos:

- Descrever o perfil clínico das crianças e adolescentes com diagnóstico de DII atendidas no Serviço de Gastroenterologia Pediátrica do IMIP.
- Avaliar o *status* inflamatório dos pacientes a partir de biomarcadores sanguíneos, macro e microscópicos e moleculares.
- Verificar a presença de polimorfismos genéticos associados à DII descritos na literatura.

Dessa forma, iniciamos uma ampla revisão da literatura sobre a DII pediátrica baseada no levantamento de informações em bancos de dados eletrônicos (MEDLINE, LILACS e SCIELO). A seguir, desenvolvemos um protocolo da pesquisa para realizar levantamento de informações via preenchimentos de formulários e consulta de prontuários, realização de exames para análise bioquímica, histológica e molecular. Esse processo é descrito com detalhes na seção de Métodos. Toda a pesquisa se manteve fiel em respeitar as diretrizes da ética em pesquisa. Os resultados obtidos foram descritos de forma a atender aos objetivos do estudo, que se iniciou pela descrição do perfil clínico da casuística, uma análise antropométrica do estado nutricional, da atividade inflamatória e os polimorfismos genéticos. A discussão norteada pelo olhar clínico analisa os resultados obtidos e chama atenção para aspectos importantes em relação ao cuidado dos pacientes pediátricos. Nas considerações finais, procuramos ressaltar a importância da análise crítica de casuísticas para o conhecimento médico e para a assistência aos pacientes.

Uma vez todo esse processo finalizado, a experiência de acompanhar os pacientes com DII de perto e de forma detalhada proporcionou uma vivência que seria impossível sem a construção desta tese. A percepção das características dos pacientes, da evolução da doença e da contínua necessidade de pesquisa e aprendizado associado aos ensinamentos provenientes do período da pós-graduação do doutorado foi essencial para a minha formação como gastroenterologista pediátrica. Contudo, permito-me dizer que conhecer e conviver com esse grupo de pacientes foi a maior e melhor de todas as gratificações da minha experiência como médica e como aluna do doutorado, reafirmando a minha vocação e anseios.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Introdução

A doença inflamatória intestinal (DII) foi relatada como tal pela primeira vez em 1932 por Crohn, Ginzburg e Oppenheimer no *Journal of American Medical Association*, como uma ileíte terminal (CROHN; GINZBURG; OPPENHEIMER, 1932). Apesar de esta ser considerada por muitos como a primeira descrição da doença, há relatos de manifestações clínicas similares desde o ano 850 d.C., como as do Rei Alfred de Wessex, que sofria de dor ao se alimentar associada a fístulas perianais, e os relatos do médico patologista italiano Giovanni Battista Morgagni, de 1761 em Pádua, que descreveu um caso de ileíte regional. E, ainda em 1813, Coombe e Saunders, no Reino Unido, descreveram o caso de um paciente apresentando “estenose singular com espessamento de íleo”. Em 1960, Lockhart-Mummery e Morson relataram que a doença de Crohn (assim conhecida em homenagem ao primeiro autor que a descreveu) também poderia cursar com acometimento do cólon, assim como já descrito na retocolite ulcerativa (o que já era defendido por Crohn), descrevendo de forma detalhada a histologia e clínica do processo inflamatório de ambas as doenças (CAMPOS; KOTZE, 2013; LOCKHART-MUMMERY; MORSON, 1960).

Hoje se sabe que a DII consiste em um grupo de doenças, com evolução crônica e períodos de agudização relacionados à ativação de um processo inflamatório no trato gastrointestinal. Os avanços dos métodos diagnósticos permitiram uma melhor compreensão de diversos aspectos da DII, tais como: seu caráter sistêmico e envolvimento do sistema imune do trato gastrointestinal (CHOY; VISVANATHAN; DE CRUZ et al., 2017), características das manifestações extraintestinais (GREUTER et al., 2016; SAUBERMANN et al., 2016), associação com câncer de intestino (HOVDE; HØIVIK; HENRIKSEN et al., 2016; MORAN; SHEEHAN; SHANAHAN, 2016), vulnerabilidade genética, descrição de síndromes monogênicas similares a ela (KAMMERMEIER et al., 2016) e, finalmente, o papel da microbiota intestinal na sua fisiopatogenia (AHMED et al., 2016). No entanto, a complexidade e a diversidade das manifestações clínicas da DII deixam muitas perguntas sem respostas, o que motiva especialistas de diferentes áreas – gastroenterologia, genética, patologia, entre outras – a continuar estudando a DII.

A explicação mais aceita hoje no tocante à patogenia da DII é que a inflamação na mucosa intestinal é resultante de uma desordem na modulação do sistema imunológico intestinal

envolvendo polimorfismos genéticos e a microbiota. Essa desregulação geraria o processo inflamatório característico dos períodos de exacerbação da doença, levando aos sintomas e alterações clínicas, laboratoriais e endoscópicas que definem a DII (SARTOR; WU, 2017). No entanto, os mecanismos patogênicos não são de um todo conhecidos e ainda não há modelos que expliquem de forma satisfatória as várias faces da doença. Faltam estudos que mostrem a diferença do seu comportamento nas várias regiões do mundo, entre crianças e adultos, e vários outros aspectos que, quando melhor entendida, possam contribuir para aprimorar o diagnóstico e a conduta terapêutica (PARK et al., 2017).

Esta revisão tem como objetivo descrever as formas de apresentação da DII na infância, assim como aspectos mais atuais da sua patogênese, fisiopatologia da inflamação, suas consequências clínicas e laboratoriais, buscando entender o paciente complexo e único que é o paciente com DII.

2.1 A doença inflamatória intestinal: aspectos gerais

A doença inflamatória intestinal engloba três apresentações fenotípicas: a doença de Crohn, a retocolite ulcerativa e a colite indeterminada. Define-se a doença de Crohn (DC) como uma inflamação granulomatosa que pode acometer todo o trato gastrointestinal de forma descontínua, estendendo-se da mucosa até às serosas (transmural); e a retocolite ulcerativa (RU), como uma inflamação não-granulomatosa restrita ao cólon, de caráter contínuo e que é limitada à mucosa. A denominação de colite indeterminada (CI) é reservada àqueles casos em que, mesmo após todo o processo de investigação diagnóstica, o paciente não preenche nos critérios diagnósticos de DC ou de RU (BOUSVAROS et al., 2007; LEVINE et al., 2013; QUILICI; QUILICI, 2012).

A incidência em adultos é estimada em torno de 200 casos de DC e 240 casos de RU para 100 mil habitantes em países desenvolvidos, sendo observado um aumento da incidência de DC nos últimos anos (MOLODECKY et al., 2012). Embora os estudos epidemiológicos ainda sugiram uma maior ocorrência da DII em países ocidentais, os dados asiáticos mostram que a doença está aumentando rapidamente nessa região (CHEON et al., 2013). Atualmente, a maior incidência da DII ocorre nos países do hemisfério norte, como os Estados Unidos, Canadá e países europeus (Figura 1, MALIK et al., 2015), e com um pico em torno da segunda década de vida e outro após os 60 anos. Chama atenção que aproximadamente 25% dos casos têm início na faixa etária pediátrica (GASPARETTO; GUARISO, 2013). Nas figuras 2 e 3, estão ilustradas a

incidência e prevalência global da RU e da DC, de acordo com as publicações até o ano de 2008, respectivamente.

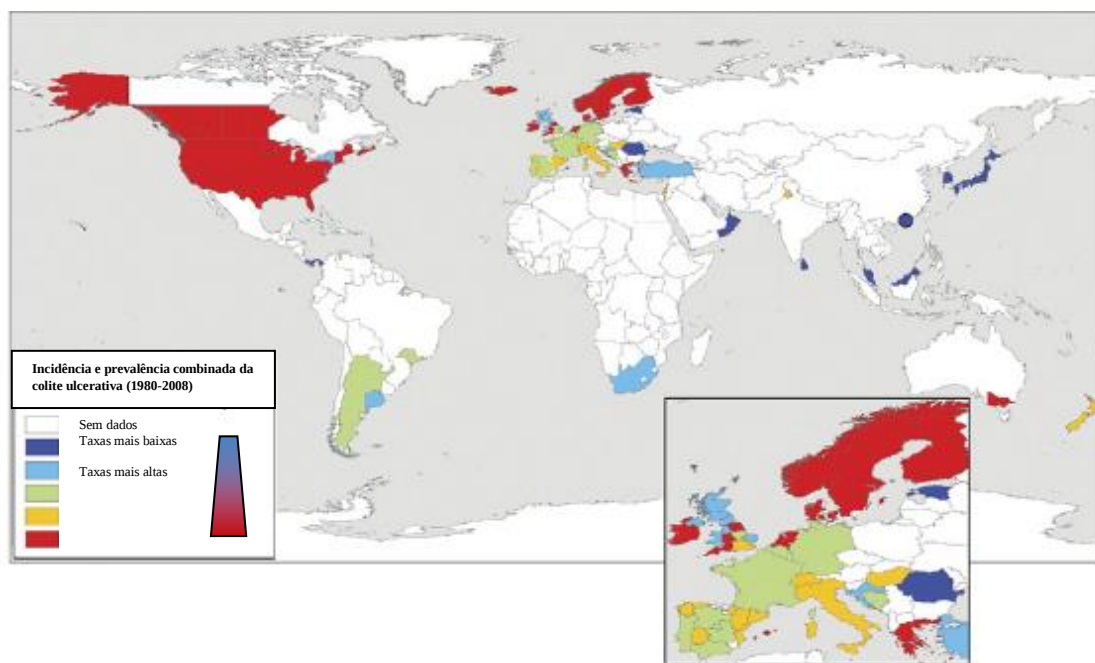
Figura 1 – Incidência da DII no mundo



Fonte: Adaptado de MALIK, 2015.

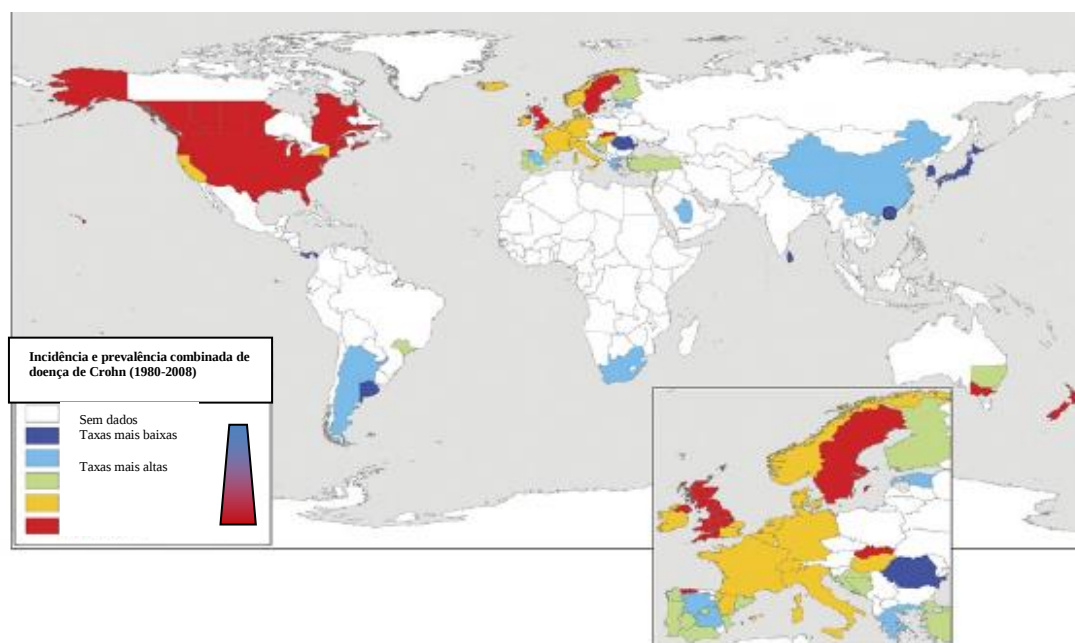
A maioria dos estudos epidemiológicos atuais foi realizada em países do hemisfério norte, de modo que o conhecimento gerado por eles não pode ser totalmente extrapolado para outras regiões do mundo, considerando que o ambiente influencia as características da doença (KIM et al., 2010). No Brasil, atualmente há apenas relatos de casuísticas de serviços, mas não estudos epidemiológicos de abrangência nacional (KODA et al., 2004; LIMA et al., 2013; SDEPANIAN et al., 2005). As particularidades da doença em diferentes populações já foram relatadas em estudos isolados, tais quais o de Kim et al. (2010), que descrevem características das crianças coreanas divergentes das encontradas nas crianças europeias e norte-americanas, tais como: menor predisposição familiar, menor ocorrência de pancolite e maior de fístulas (KIM et al., 2010).

Figura 2 - Incidência e prevalência da RU no mundo



Fonte: Adaptado de MOLODECKY et al., 2012.

Figura 3 - Incidência e prevalência da DC no mundo



Fonte: Adaptado de MOLODECKY et al., 2012.

Hoje já não se discute a contribuição da genética para a DII, considerando que há uma boa base empírica que aponta a sua participação na gênese da doença a partir da constatação de uma maior incidência da DII em populações caucasianas, da observação de um risco aumentado

em certos grupos étnicos (por exemplo, judeus ashkenazi), da forte associação familiar entre os pacientes europeus e da concordância em gêmeos monozigóticos (MALIK, 2015). Há estudos mostrando diferenças no comportamento clínico da doença provavelmente associado a polimorfismos genéticos, o que fortalece o argumento da contribuição genética na etiopatogenia da DII (CHEON, 2012; KIM et al., 2010).

No entanto, apesar do grande número de estudos sobre genes associados à DII, ainda é necessário um melhor entendimento sobre o papel da genética na sua origem (NG, 2013). A grande quantidade de polimorfismos associados à DII e o caráter poligênico da doença na maioria dos casos dificultam essa investigação (VENEMA et al., 2017). Por outro lado, recentemente, tem chamado a atenção dos clínicos um grupo de pacientes com início precoce ou muito precoce da doença e levantada a hipótese de que essa apresentação esteja mais fortemente associada à herança monogênica (UHLIG et al., 2014).

O papel do ambiente, em particular o ambiente luminal onde está a microbiota intestinal, é outro aspecto que tem sido bastante estudado em relação à patogênese da DII. O modelo atualmente proposto para explicar a etiopatogenia da DII sugere uma interação complexa entre fatores ambientais luminais e genéticos (ABDULLAH et al., 2013; CHOY; VISVANATHAN; DE CRUZ, 2017; FUKATA; ABREU, 2009; SCHIRBEL; FIOCCHI, 2010).

Sabe-se que, em condições normais, o trato gastrointestinal é continuamente exposto a uma variedade de antígenos, incluindo bactérias entéricas e alimentos, que levaria a uma “inflamação fisiológica” com a supressão de respostas imunológicas excessivas a antígenos estranhos. Na DII, a homeostase é quebrada como consequência da alteração de elementos da barreira intestinal, levando à invasão bacteriana e à inflamação (HISAMATSU et al., 2013). Como Schirbel e Fiocchi (2010) afirmaram em revisão da literatura, a resposta imunológica é o braço efetor que mede a inflamação e compreender sua função e seu desequilíbrio no trato gastrointestinal na DC e na RU é fundamental para desvendar os complexos mecanismos da inflamação intestinal crônica (SCHIRBEL; FIOCCHI, 2010).

Os polimorfismos genéticos relacionados à DII gerariam “defeitos” em diferentes pontos do processo, como, por exemplo, na função de barreira intestinal contra bactérias intestinais comensais e/ou patogênicas. A perda da função de barreira permitiria a invasão de elementos da microbiota intestinal, tal como acontece no modelo que explica como a invasão bacteriana desencadeia o processo inflamatório a partir da ativação de citocinas pró-inflamatórias na tentativa de bloquear o agente invasor (CHOY; VISVANATHAN; DE CRUZ, 2017).

Em suma, a origem do processo inflamatório na DII resulta da interação de fatores genéticos, bacterianos e imunológicos. Os polimorfismos genéticos criam condições que levam

à desregulação imunológica e à ativação de cascatas inflamatórias que resultará em agressão à mucosa intestinal. Portanto, nesse contexto, a interação entre a microbiota e a mucosa intestinal gera uma resposta inflamatória anormal, que seria o ponto de partida da DII (MEZOFF; ALY, 2013).

Contudo, o conhecimento acerca dos polimorfismos genéticos envolvidos na DII, assim como de que forma os acontecimentos intra e extrauterinos configuram a expressão gênica nessa entidade, ainda é incompleto. Fiochi, em 2012, afirmou que o paradigma determinístico (genótipo/fenótipo) na DII não é mais aceito (FIOCCHI, 2012). A interação genes e meio ambiente, mais especificamente, o ambiente luminal, se daria de uma forma bem mais complexa e não seria igual para todos os indivíduos, o que justificaria os diferentes fenótipos da DII (FIOCCHI, 2012). O desconhecimento é agravado pela complexidade das interações: gene-gene, gene-ambiente e gene-microbiota (FIOCCHI, 2012; GEREMIA et al., 2014). O produto dessas interações resultaria na heterogeneidade clínica e laboratorial característica da DII (MATRICON, 2010; UHLIG et al., 2014).

2.1.1 As características fenotípicas da DII e as particularidades da DII no paciente pediátrico

As formas chamadas clássicas da DC e da RU são observadas com menos frequência nos pacientes pediátricos do que nos adultos (DE BIE et al., 2013). Nas crianças com DC, por exemplo, é comum ocorrer padrão contínuo de inflamação de todo cólon (pancolite), o que se assemelha mais à RU no adulto. Assim como também se observa inflamação descontínua em 10 a 30% das crianças portadoras de RU, tais como o que ocorre em adultos com DC. E ainda acometimento ileal por refluxo de conteúdo inflamatório do cólon para o íleo terminal, denominado ileíte de *backwash*, pode ser visto na RU na infância devido à ocorrência mais frequente nessa faixa etária da forma ileocolônica (LEVINE et al., 2013).

Essas formas “atípicas” dificultam mais ainda o diagnóstico da DII na infância, sendo essa dificuldade agravada pela apresentação frequente de pancolite em ambas as formas da doença e pela pouca identificação do granuloma no estudo histológico em casos de DC (DE MATOS et al., 2008; KELLER et al., 1990).

De uma maneira geral, o curso clínico característico da DII, tanto na DC quanto na RU, consiste em sinais e sintomas associados com atividade inflamatória intercalada por períodos de remissão. Nos períodos de atividade inflamatória, a mucosa intestinal exhibe alterações que variam segundo a intensidade da agressão e o fenótipo da doença. Observa-se períodos de

diarreia, enterorragia, dor abdominal, febre, perda de peso, dores articulares, entre outras queixas. No âmbito laboratorial, os biomarcadores de atividade inflamatória sanguínea e fecal mostram-se alterados: aumento da velocidade de hemossedimentação (VHS), da proteína C-reativa (PCR), da calprotectina fecal, dentre outros (ABRAHAM et al., 2012; GASPARETTO; GUARUSO, 2013).

No estudo histológico, verificam-se infiltrado de neutrófilos, inflamação e abscessos de cripta, granulomas, erosões, fissuras e destruição da arquitetura celular da mucosa. Após cessar o processo inflamatório, observa-se a regeneração do tecido com o aparecimento de processos regenerativos anômalos que geram criptas aberrantes, pólipos de regeneração, estenoses secundárias à fibrose tecidual e fístulas. Essas alterações inflamatórias e cicatriciais podem levar a complicações clínicas, como obstrução e perfuração intestinal, câncer e risco de morte (LEVINE et al., 2013).

Pigneur et al. (2010) mostraram que crianças com DC apresentam um curso clínico mais grave do que o de pacientes adultos, além de escore de atividade de doença que aumenta a cada ano, levando a uma maior necessidade de prescrições de imunossupressores (PIGNEUR et al., 2010). O predomínio de pancolite e o comprometimento do crescimento são frequentes na DII pediátrica. Abraham et al. (2012), em uma revisão sistemática, encontraram 10 a 40% de retardo de crescimento durante o acompanhamento de crianças com DC e, em 17% dos casos, na RU (ABRAHAM et al., 2012).

O comportamento diferenciado da DII em crianças levou um grupo de especialistas a buscar um consenso em relação à classificação da DII pediátrica. Apesar de existir classificações para DII em adultos há quase duas décadas, sendo a mais recente a de Montreal (SILVERBERG et al., 2005), apenas em 2011 foi elaborada uma versão desta classificação voltada para crianças, a Classificação de Paris (Quadro 1 e 2; LEVINE et al., 2011). Nessa classificação, caracterizam-se a DC e a RU de acordo com a idade de início, a extensão, o comportamento e a repercussão no crescimento (LEVINE et al., 2011).

O paciente pediátrico que apresenta doença de início precoce ou muito precoce é considerado como um paciente com doença mais agressiva, pouco responsiva ao tratamento habitual e com maior risco de morrer (LEVINE et al., 2011; BENCHIMOL et al., 2014). Em alguns casos, existe uma provável associação com determinados polimorfismos genéticos, sugerindo herança monogênica (KELSEN et al., 2015; RUEMMELE, 2010). Alguns desses pacientes têm colite associada com imunodeficiências primárias e recebem diagnóstico específico relacionado às características clínicas da deficiência imunológica; no entanto, quando predomina o fenótipo clínico associado à inflamação intestinal, a doença é denominada DII-

símile (*IBD-like*). São descritos casos associados à deficiência de interleucina 10, citocina anti-inflamatória, que tem sido identificada em alguns pacientes com DII de início muito precoce, cujo fenótipo clínico é de colite – tipo DII-símile (GLOCKER et al., 2009; MORAN et al., 2013; PIGNEUR et al., 2013; UHLIG et al., 2014).

Quadro 1 – Classificação de Paris para DC

Idade no diagnóstico	A1a: 0-10 anos* A1b: 10-17 anos A2: 17-40 anos A3: >40anos
Localização	L1: 1/3 íleo distal, doença limitada ao ceco. L2: colônica L3: ileocolônica L4a: doença proximal de trato gastrointestinal superior ao ligamento de Treitz L4b: doença do trato gastrointestinal superior do ligamento de Treitz ao 1/3 do íleo distal
Comportamento	B1: não estenosante, não fistulizante B2: estenosante B3: fistulizante B2B3: estenosante e fistulizante ao mesmo tempo ou em tempos diferentes P: doença perianal
Crescimento	G0: sem evidência de atraso do crescimento G1: com atraso do crescimento

Fonte: LEVINE et al., 2011

Quadro 2 – Classificação de Paris para RU

Extensão	E1: proctite ulcerativa E2: retocolite esquerda (distal à flexura esplênica) E3: extensa (distal à flexura hepática) E4: pancolite (proximal à flexura hepática)
Gravidade	S0: nunca grave S1: alguma vez grave

Fonte: LEVINE et al., 2011

Por outro lado, as crianças que têm doença de início tardio, ou seja, a partir dos 6 anos de idade, segundo a classificação de Paris (LEVINE et al., 2011), apresentam um fenótipo clínico e evolução mais parecida com o padrão apresentado pelos pacientes com doença de início na idade adulta. Nesses casos, há menor associação com os polimorfismos genéticos já conhecidos e, na sua maioria, é mais provável que a herança seja poligênica (BIANCO; GIRARDELLI; TOMMASINI, 2015; LEES et al., 2011).

A evolução e as complicações da DII, tanto em adulto quanto em criança, estão intimamente ligadas ao controle ou não da atividade inflamatória da doença (PIGNEUR et al., 2010). O ganho de peso, a manutenção da velocidade de crescimento, a normalidade dos exames laboratoriais e endoscópicos levariam o paciente a um estado de remissão da inflamação da DII, o que hipoteticamente o deixaria livre de sintomas e complicações (ZALLOT; PEYRIN-BIROULET, 2013). Contudo, essa linearidade de eventos não é vista na prática. Os indicadores clínicos e laboratoriais de atividade inflamatória podem se comportar de forma diferente do esperado e nem sempre mostrar positividade simultaneamente. Nesse contexto, é necessário o conhecimento de cada um desses indicadores e seu significado para melhor avaliação do paciente e definição do tratamento (LEWIS, 2011).

O tratamento atual da DII, em todos os indivíduos, baseia-se no controle da atividade inflamatória. O tratamento da atividade inflamatória consiste no uso de corticoesteroides ou uso de dieta enteral exclusiva com fórmulas elementares ou poliméricas. Esta última opção de tratamento da fase ativa da DII tem níveis de evidências científicas e resultados satisfatórios na prática pediátrica. Para manter o paciente em remissão é necessário uso contínuo de anti-inflamatórios com ação no intestino, tais como a mesalazina, imunossupressores, como a azatioprina, e agentes biológicos, como o antifator de necrose tumoral α (TNF α) (RUEMMELE et al., 2014; TURNER et al., 2012).

A atividade inflamatória associada à doença deve ser compreendida desde o nível molecular, celular, tecidual até as suas manifestações macroscópicas e sistêmicas. Entender todo esse processo é um objetivo ainda distante. No entanto, o conhecimento sobre o problema vem se ampliando nos últimos anos e, no futuro, permitirá uma abordagem diagnóstica e terapêutica racional e individualizada (CORFIELD et al., 2011; PARK et al., 2017).

2.2 A inflamação na DII

É esperado que o organismo defenda-se de qualquer dano tecidual desencadeando uma resposta inflamatória. A inflamação envolve aspectos vasculares, celulares e moleculares. Classicamente, manifesta-se por rubor, calor, edema, dor e prejuízo funcional. Na inflamação aguda, predomina a resposta imunológica inata e, na inflamação crônica, o dano é persistente, mais complexo e vai se modificando progressivamente (CRUVINEL et al., 2010).

2.2.1 Aspectos gerais da resposta inata e adaptativa da mucosa intestinal

A partir de um modelo aplicado a agressão por um agente infeccioso, pode-se compreender algumas características da resposta inata e adaptativa da mucosa intestinal (ABRAHAM; MEDZHITOV, 2011). Na resposta inata, principalmente no processo agudo, há uma participação importante de células efectoras – macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células *natural killer*. As barreiras anatômicas e a integridade do muco têm um papel importante, merecendo destaque a fagocitose, a liberação de mediadores inflamatórios, a ativação de proteínas do sistema complemento, bem como a síntese de proteínas da fase aguda, citocinas e quimiocinas. O mecanismo é ativado por moléculas comumente encontradas na superfície de microorganismos, denominadas padrões moleculares associados a patógenos (*PAMPs*), que interagem com receptores presentes nas membranas celulares (CHOY; VISVANATHAN; DE CRUZ, 2017). A interação dessas moléculas com os receptores de reconhecimento padrão (RRP) ativam a resposta imunológica inata (ABRAHAM; MEDZHITOV, 2011). É uma interação análoga à reação antígeno-anticorpo, no entanto, não há resposta adaptativa e não confere imunidade em longo prazo (CRUVINEL et al., 2010).

O papel central dos RRP é facilitar a opsonização, ativar o sistema complemento (SC) e a fagocitose. Destacam-se pela capacidade de ligação ao patógeno, iniciando a resposta inflamatória, e estão localizados nas células dendríticas, neutrófilos e macrófagos (CHOY; VISVANATHAN; DE CRUZ, 2017). O sistema complemento age mediante a ação de substâncias solúveis, como as proteínas do SC e a proteína C reativa (PCR), após a ligação aos RRP. Posteriormente, o patógeno é internalizado em vesículas chamadas fagossomos. Estas se fundem ao lisossomo, que libera seu conteúdo, digerindo e eliminando o patógeno.

A complexa composição do sistema imunológico inato (SII) – com suas barreiras anatômicas, RRP e múltiplos tipos de células – permite uma resposta rápida e eficaz contra o

patógeno invasor. Essa resposta leva a uma “linha de produção” de citocinas que funciona como uma ponte para ativação das células T e ativação do sistema imune adaptativo (SAI) (CHOY; VISVANATHAN; DE CRUZ, 2017).

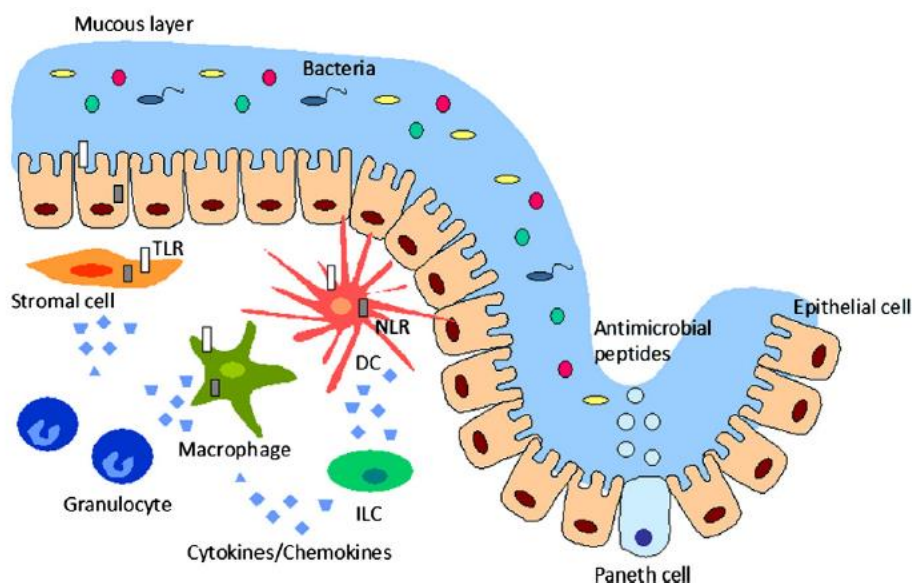
Em contraste com o SII, o SIA desenvolve respostas altamente específicas ao antígeno. O processo de apresentação do antígeno pela célula dendrítica, pelo macrófago e pelas células B induz o desenvolvimento e a maturação de células imunológicas em lugares indutores como o tecido linfóide do mesentério e o GALT – tecido linfóide associado ao intestino (*gut associated lymphoid tissue*). O linfócito Th0 é ativado e se diferencia em Th1 (responsável pelo *clearance* intracelular de patógenos), Th2 (responsável pela resposta alérgica e a parasitas) ou Th17 (responsável pela resposta a bactérias e fungos) (CHOY; VISVANATHAN; DE CRUZ, 2017).

2.2.2 O processo inflamatório na DII

O epitélio intestinal é a maior interface entre o meio interno do organismo e o meio exterior; reagindo a diversos estímulos não nocivos com um “estado de inflamação controlada”. Essa resposta inflamatória que não está associada à doença funciona como um mecanismo fisiológico. A “inflamação controlada” tem como objetivo defender o hospedeiro, reparar o tecido e restabelecer a homeostase (ABRAHAM; MEDZHITOV, 2011). O intestino, por ser um órgão que está em constante comunicação com a sua microbiota e com o meio externo, necessita desse processo de “inflamação controlada” e reparação permanente. Em pacientes com DII, a inflamação é em graus e duração excessivos e ocorrem lesões teciduais que se manifestam por dano e morte celular, destruição da arquitetura tecidual e perda da função, levando a fibrose, metaplasia, autoimunidade e câncer (RIEDER; FIOCCHI, 2013).

A mucosa intestinal está constantemente exposta a antígenos microbianos e antígenos oriundos da dieta. Certo grau de permeabilidade é necessário para que o intestino exerça sua função e mecanismos de autorregulação asseguram a homeostasia. Quando algum fator leva à perda desse equilíbrio, é gerada uma condição que propicia a inflamação crônica mediada pelo sistema imunológico por meio das suas respostas inatas e adaptativas (GEREMIA et al., 2014). A doença inflamatória intestinal surge no contexto de grande complexidade onde cada componente – seja associado à mucosa ou ao sistema imunológico intestinal, à microbiota intestinal e/ou ao ambiente – tem um papel importante (Figura 4).

Figura 4 – Representação da mucosa intestinal e do SII e do SIA



Fonte: GEREMIA et al., 2013.

2.2.2.1 O sistema imunológico inato (SII)

O SII do trato gastrointestinal atua através das suas barreiras anatômicas (barreira epitelial e mucosa), RRP e células. A barreira mucosa é a primeira barreira contra os antígenos microbianos, sua principal função é impedir o contato desses antígenos com o meio interno. O muco faz parte da barreira mucosa, é produzido pelas células caliciformes formando duas camadas – uma externa e uma interna – e é composto de proteínas, carboidratos e lipídeos, sendo o seu principal componente uma glicoproteína, a mucina (CHOY; VISVANATHAN; DE CRUZ, 2017). A camada externa é mais fluida, tendo mucina, antibacterianos (*antimicrobial peptides* – AMPs) e bactérias comensais. Já a camada interna é mais consistente e aderida ao epitélio, sendo livre de bactérias (GEREMIA et al., 2014; CHOY; VISVANATHAN; DE CRUZ, 2017).

A barreira epitelial também tem funções de digestão, absorção e secreção. As células das criptas do epitélio proliferam e migram para mantê-lo íntegro e repor as células que tenham sofrido lesão ou apoptose, permitindo que a camada epitelial se renove a cada dois a três dias. O epitélio é formado por enterócitos e outras células epiteliais mais especializadas, como as células de Paneth, as células caliciformes e células enteroendócrinas (CHOY; VISVANATHAN; DE CRUZ, 2017). As células de Paneth secretam substâncias antibacterianas (lisozimas, α -defensinas e outras glicoproteínas com efeito antibacteriano) e fagocitam bactérias.

Em condições fisiológicas, os AMPs são secretados pelas células de Paneth após o reconhecimento de componentes bacterianos pelos RRP expressos também nas células da barreira epitelial. Os AMPs estão mais concentrados na camada interna de muco contribuindo para a manutenção da sua esterilidade (CHOY; VISVANATHAN; DE CRUZ, 2017). Os AMPs das células de Paneth são liberados após a estimulação do NOD2 pelos lipolissacarídeos e dipeptídeos muramílicos (ABREU, 2005). Os RRP, como os *toll-like receptors* (TRLs) e o NOD (*nucleotide binding oligomerization domain*) constituem uma grande família e com particular interesse para a DII estão os receptores NOD-like (ABDULLAH et al., 2013; CHOY; VISVANATHAN; DE CRUZ, 2017).

Os TLRs são proteínas transmembrana que reconhecem proteínas moleculares extracelulares associadas a patógenos e também localizadas intracelularmente nas membranas dos endossomos no epitélio intestinal. No intestino existe um estado de tolerância onde os TLRs não estão ativados. Mas a quebra da tolerância leva à ativação e pode contribuir para a inflamação crônica, como na DII. Alguns estudos sugerem que genes dos TLRs 2 e 4, especificamente, estão ativados em pacientes com DII (CHOY; VISVANATHAN; DE CRUZ, 2017).

Outro complexo de múltiplas moléculas, denominado inflamassoma, participa do desencadeamento da resposta imunológica inata. É ativado em resposta a estímulos endógenos e microbianos para evitar a quebra da homeostase celular, protegendo a integridade da célula e controlando a interação entre o hospedeiro e microbiota. Quando ativado, induz a produção de interleucinas pró-inflamatórias (IL1 e IL8) que promovem o recrutamento de fagócitos, angiogênese, reparo epitelial no local da lesão. No intestino, alterações na sua expressão podem levar à perda de proteção contra infecções, disbiose, inflamação e perda no reparo da barreira epitelial (CHOY; VISVANATHAN; DE CRUZ, 2017).

Outras estruturas na barreira epitelial do intestino estão envolvidas no processo inflamatório e contribuem para a patogênese da DII. Os desmossomos, as “*tight junctions*” e as junções de adesão mantêm a integridade da barreira epitelial em indivíduos saudáveis protegendo contra antígenos indesejáveis. A falha na barreira epitelial por meio da disfunção das suas células ou das estruturas de adesão celular tem sido descrita como possíveis mecanismos patogênicos da DII (GEREMIA et al., 2014).

Nos últimos anos, diversos polimorfismos genéticos têm sido identificados em pacientes portadores de DII e vários estudos foram realizados com o objetivo de analisar o seu papel na desregulação imunológica que caracteriza essa doença (BEGUE et al., 2011; BIANCO; GIRARDELLI; TOMMASINI, 2015; CHRISTODOULOU et al., 2013). Mas, acredita-se ser pouco provável que um modelo único explique de forma satisfatória a patogenia da DII (CHOY;

VISVANATHAN; DE CRUZ, 2017; SARTOR; WU, 2017). Os polimorfismos do NOD2 e dos genes de autofagias estão entre os mais estudados.

2.2.2.1.1 Os NOD like receptor

A “família” NLR (*NOD like receptors*) é representada pelos NOD1 (*nucleotide binding oligomerization domain containing 1*) e NOD2 (*nucleotide binding oligomerization domain containing 2*). O NOD2 foi o primeiro gene associado à DII por Hugot (2001). O NOD2 é considerado um RRP, estando presente nos monócitos do sangue periférico e pelos enterócitos. Está localizado no cromossomo 1 e codifica uma proteína envolvida no reconhecimento do componente do muramyl-dipeptídeo da parede celular peptidoglicana da bactéria que ativa a via do fator NF- κ B (*kappa light chain enhancer of activated B cells*) (HUGOT et al., 2001). A “família” do NOD ativa as vias de sinalização que promovem uma cascata de reações resultando na ativação do fator NF- κ B, estimulando a transcrição de genes responsáveis pela produção de mediadores pró-inflamatórios, assim como a interação e ativação do sistema imunológico adaptativo (PASTORELLI et al., 2013; VIGNAL et al., 2007). Logo, a ação do NOD resulta na efetiva resposta contra antígenos agressores e na eliminação desses.

Desde a sua primeira descrição, o NOD2 é o gene apontado com maior frequência nos estudos que analisam genes associados à DC, em homozigose ou mesmo em heterozigose, sendo descritos três polimorfismos maiores associados à DC em caucasianos: o Arg702Trp, Gly908Arg e Leu1007fsinsC (LACHER, 2010).

Defeitos na produção de AMPs, relacionados ao NOD2 e que repercutem na adesão celular, permitem o contato e a invasão de antígenos agressores, gerando o processo inflamatório crônico presente na DII (VIGNAL et al., 2007). Polimorfismos do NOD2, associados a defeitos na expressão das defensinas, e os genes associados com a adesão celular (HNF4A, CDH1, LAMB1 e GNA12) têm sido descritos em pacientes com DC e/ou a RU. O Quadro 3 mostra alguns estudos sobre a associação entre o NOD2 e a DII.

2.2.2.1.2 Genes associados à autofagia

A autofagia é um processo intracelular responsável pela degradação de proteínas e organelas produzidas em excesso, danificadas ou velhas e que, se não forem removidas, comprometem a homeostase (Figura 5) (HOOPER et al., 2017; LEES et al., 2011). A autofagia

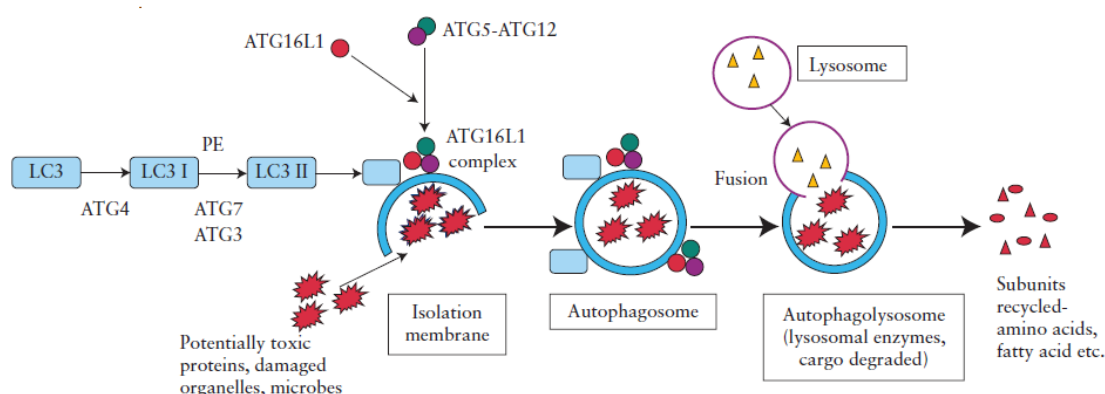
está sempre ativa em um nível basal na maioria das células e sua atividade é modulada pelo estresse, hipóxia, infecção e desnutrição (LEES et al., 2011). Todo o processo de autofagia é coordenado pelo complexo de proteínas ATG (*autophagy related protein*). O complexo ATG16L1 está associado à formação do autofagossomo, como é mostrado na Figura 5 (HOOPER et al., 2017).

Um dos primeiros genes de autofagia associado à DC foi o ATG16L1. Os polimorfismos do gene ATG16L1A resultam na perda da proteína com o mesmo nome e consequentemente no aumento das interleucinas pró-inflamatórias IL1 β e IL18. A proteína ATG16L1 também age como modulador da atividade do NOD2 e, quando ela está ausente, a sua ação pró-inflamatória aumenta (HOOPER et al., 2017). Tem ação importante como apresentadora de antígeno e ativa o SIA. Outros polimorfismos de genes associados à autofagia podem estar envolvidos na patogenia da inflamação da DII, no entanto ainda carecem de estudos (BIANCO; GIRARDELLI; TOMMASINI, 2015).

Quadro 3 – Estudos genéticos que associam o gene NOD2 à DII e seus fenótipos.

Estudo	População	Local	NOD2	Conclusão
IPPOLITI et al, 2010	731 pacientes	Los Angeles, EUA	Variantes: R702W, G908R, 1007fs.	A presença dos alelos foi associada ao envolvimento do intestino delgado, com o fenótipo fibroestenotante, com história de cirurgia do intestino delgado e inversamente com o fenótipo <i>retocolite-like</i> .
LACHER et al, 2010	171 pacientes	Monique, Alemanha	Variantes: p.Arg702Trp, p.Gly908Arg, p.1007fs.	As três mutações conferem susceptibilidade à DC, especialmente a p.1007fs que aumenta o risco do comportamento fibroestenótico e necessidade de ressecção cirúrgica.
STRONATI et al, 2010	15 pacientes com RU e 10 controles	Roma, Itália	Expressão do NOD2.	A expressão de genes de imunidade inata está aumentada na mucosa do cólon inflamado.
GAZOULI et al, 2010	110 pacientes com DC	Atenas, Grécia	Variantes R702W, G908R e 3020insC. .	O polimorfismo 3020insC foi mais frequentemente em crianças com DC de início na infância do que em pacientes com doença de Crohn de início na idade adulta.
BAPTISTA et al, 2008	187 pacientes com DC e 255 controles sadios	Curitiba e São Paulo, Brasil	Variantes R702W, G908R, 3020insC.	NOD2 confere susceptibilidade à DC na população brasileira. Contudo a presença dessas variantes não influenciam o fenótipo.
LEVINE et al, 2007	678 pacientes com DC	Tel Aviv, Israel Wisconsin, EUA Roma, Itália	Variantes R702W, G908R, fs1007Insc.	Na DC de início precoce, crianças com mutações do NOD2 demonstraram mais ileocolite e menos ileíte isolada. Crianças sem mutações têm só apresentação colônica, sugerindo que esse fenótipo é menos associado com genes de fenótipos de início precoce.
DE RIDDER et al, 2007	799 pacientes com DII	Amsterdã, Holanda	Variantes R702W, G908R, e 3020insC.	Polimorfismos do 3020insC no NOD2 e polimorfismos de simples nucleotídeos rs3792876 em SLC22A4/5 ocorreram estatisticamente com mais significância na DC de início pediátrico do que em adultos com DC. Polimorfismos de 3020insC no NOD2 e polimorfismos de simples nucleotídeos rs2165047 em DLG5 foram associados a fenótipos específicos nesta coorte de início pediátrico.

Figura 5 – A via da autofagia



Fonte: HOOPER et al., 2017.

2.2.2.2 O sistema imunológico adaptativo

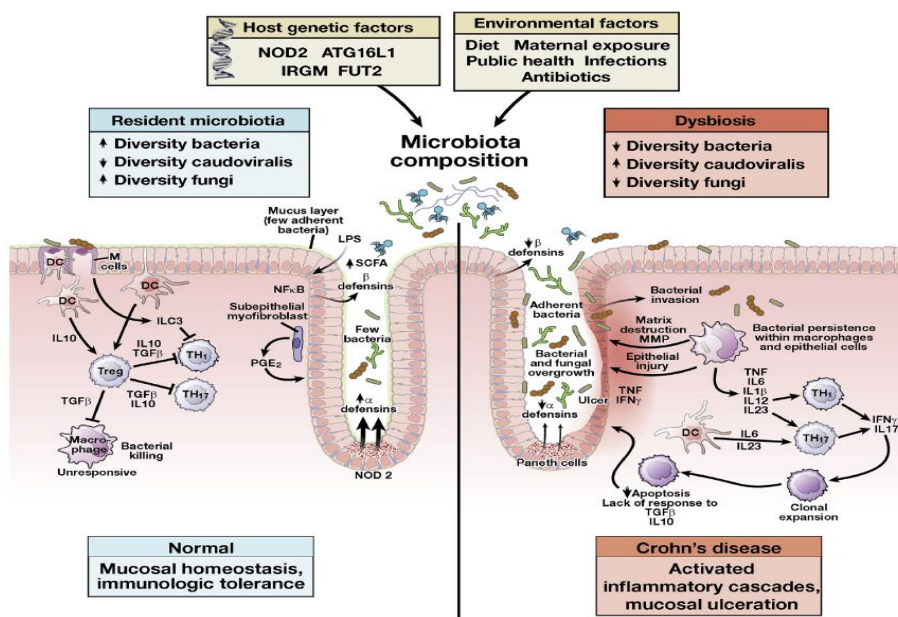
O SII se comunica com o SIA no intestino por meio de “pontes” representadas pelas células linfoides inatas, as células T não variadas associadas à mucosa (MAIT – *mucosal-associated invariant T cells*) e as células apresentadoras de antígeno (CHOY; VISVANATHAN; DE CRUZ, 2017). As células linfoides inatas estão presentes na mucosa dos tecidos e ajudam a manter a integridade da barreira epitelial. As células MAIT são células que diferem das células T; são abundantes no intestino, onde se localizam preferencialmente. Sua função ainda não está totalmente esclarecida, especula-se que funcionam como a ponte entre o SII e o SIA na defesa contra as bactérias. As células apresentadoras de antígeno atuam na conexão do SII e do SIA, ativando e modulando a resposta das células T sendo cruciais para manter a homeostase (CHOY; VISVANATHAN; DE CRUZ, 2017).

A célula Th17 tem também a sua produção induzida pelo TGF β , IL6 e IL23. Esta célula produz IL17A, IL17F, IL21 e IL22. As células Th17 são importantes na inflamação da DII, pois estudos mostram aumento da produção dessas células nessa doença (MAGYARI et al., 2014).

As células Treg, também estimuladas pelo TGF β , são responsáveis por monitorar a resposta imunológica, prevenindo a sua ativação excessiva e potencialmente agressiva. Atualmente postula-se que as células Th17 e Treg compartilham de vias em comum, levando às ligações funcionais entre essas duas células (GEREMIA et al., 2014).

A Figura 6 mostra um modelo da interação entre a resposta inata, a resposta adaptativa e a microbiota do paciente, apontando a influência de fatores genéticos e fatores ambientais em um indivíduo saudável e um paciente com DC.

Figura 6 – Exemplo da interação entre a imunidade inata, imunidade adaptativa e microbiota no paciente normal e no paciente com DC.



Fonte: SARTOR; WU, 2017.

2.2.2.2.1 Interação SII-SIA: o papel da IgA

Os linfócitos B também são células apresentadoras de antígenos, além de agirem na produção de anticorpos e geração de citocinas. Em particular as células B intestinais diferenciam-se em plasmócitos e secretam IgA. Sabe-se que a IgA é o anticorpo mais abundante no corpo humano e é de vital importância para o trato gastrointestinal, sendo produzida nas placas de Peyer com o estímulo do TGF- β que é o gatilho para a diferenciação das células B em plasmócitos. A IgA, após interação com o receptor de imunoglobulina na superfície lateral do epitélio, é transportada para o lúmen intestinal como IgA secretória. Sua ação no lúmen é evitar o acesso da bactéria e toxinas ao hospedeiro. A IgA age no muco reduzindo a expressão do epítipo da bactéria e de antígenos alimentares, diminuindo a colonização de bactérias no intestino. Também tem a função de apresentar a bactéria comensal de forma seletiva para células dendríticas via um

complexo formado por bactéria-IgA que atravessa a mucosa ao interagir com um receptor especializado. Todas essas funções fazem com que as células B e a IgA estejam presentes nesta complexa interação entre o SII e o SAI (FAVA; DANESE, 2011).

2.2.2.2.2 *Interação SII e SIA: o papel das citocinas*

As citocinas atuam como mensageiros celulares e agem de forma coordenada na indução ou repressão de sua própria síntese bem como de outras citocinas ou seus receptores (CRUVINEL et al., 2010). Por sua vez, as interleucinas (IL) são um subgrupo de citocinas com características peculiares: humorais, pequenas (4-15 kDa), induzíveis por proteínas ou glicoproteínas imuno-regulatórias, medeiam a comunicação entre as células, regulam o crescimento e a diferenciação celular, tendo um papel central no desenvolvimento e homeostase do sistema imunológico (MÚZES et al., 2012). Elas agem nas células-alvo, especialmente leucócitos, ligando-se aos receptores específicos e iniciando a transdução de sinais e de vias de segundo mensageiro (MÚZES et al., 2012).

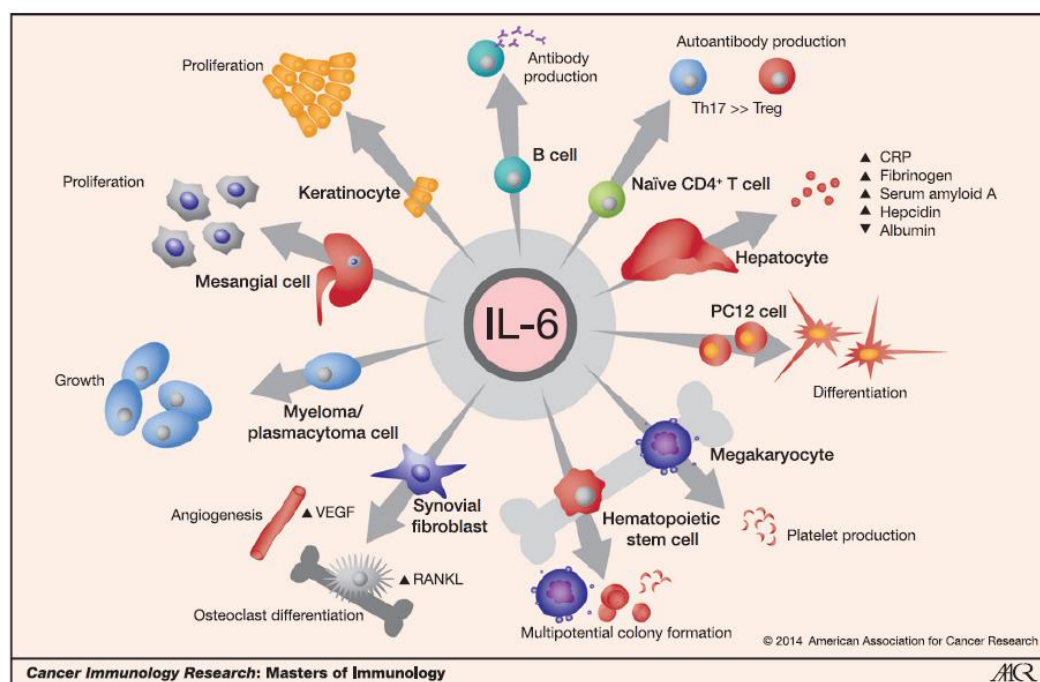
A interleucina (IL) desempenha um papel importante na interação do sistema imunológico inato e adaptativo, sendo o principal mediador da diferenciação da célula T induzindo ou não uma resposta inflamatória. Existem muitas citocinas e o efeito resultante de suas ações é complexo. De forma simplista, as citocinas, segundo seus tipos de ação, são classificadas em pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. A interação das citocinas $\text{IFN}\gamma/\text{IL}12$ e $\text{IL}23/\text{IL}17$ leva à liberação de um conjunto complexo de citocinas pró-inflamatórias ($\text{IL}18$, $\text{IL}2$, $\text{IL}1$, $\text{IL}21$, $\text{IL}22$). As células $\text{Th}1$ e $\text{Th}2$ produzem $\text{IL}6$ e $\text{TNF}\alpha$. A ativação dessa rede de citocinas leva ao recrutamento de mais células efetoras e o início da inflamação da mucosa, que pode se tornar crônica devido à falta de regulação da resposta imunológica (MAGYARI et al., 2014).

O SIA está fortemente envolvido no processo inflamatório crônico do intestino na DII (MATRICON, 2010). As células $\text{Th}1$ induzem a produção de $\text{IL}12$, $\text{IFN}\gamma$ e $\text{TNF}\alpha$ – respostas anormais dessas células induzidas pelos níveis aumentados de $\text{IL}18$ e $\text{IL}12$ são associadas a DC. O $\text{IFN}\gamma$ induz a morte do enterócito e estimula a liberação de $\text{TNF}\alpha$ a partir da ativação de macrófagos (GEREMIA et al., 2014). A resposta das células $\text{Th}2$ é induzida pela $\text{IL}13$, produzindo $\text{IL}4$, $\text{IL}5$ e $\text{IL}13$ e são associadas à patogênese da RU (GEREMIA et al., 2014).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF α) é uma citocina pró-inflamatória sintetizada por células mononucleares. A síntese de TNF α é ativada por receptores *toll-like* (TLR-4) existentes nas membranas celulares. A ativação dos TLR-4 induz a ativação de fator nuclear κ B (NF- κ B) e proteínas quinases-mitógenas, causando aumento da proliferação celular e diferenciação de macrófagos e a indução de expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF α , IL6 e IL12. A ativação dessas vias é importante para homeostase, no entanto, quando desreguladas, induzem proliferação celular, diferenciação e liberação de várias citocinas pró-inflamatórias, incluindo o próprio TNF α . Ainda, a sinalização do TNF α induz a ativação da caspase-8 e apoptose de células intestinais epiteliais, induzindo mudanças na expressão epitelial das proteínas das *tight junctions* entre pacientes com DC, além de diminuir a função da barreira mucosa dos pacientes com DII, exacerbando a inflamação (MAGYARI et al., 2014; MÜZES et al., 2012). O TNF α é a principal citocina que induz a diferenciação de células estromais em miofibroblastos e a produção de metaloproteínases que degradam o tecido (GEREMIA et al., 2014).

A IL6 é uma citocina multifuncional envolvida na regulação de respostas imunes, na reação de fase aguda e hematopoese (Figura 7). O pleiotropismo é uma de suas principais características e em parte explica porque está expressa em várias células. Em resposta a infecções ou lesões teciduais por traumas, a IL6 é prontamente sintetizada e ativa a resposta imunológica, induzindo a diferenciação de células B ativadas em células plasmáticas produtoras de imunoglobulinas (TANAKA; KISHIMOTO, 2014). A IL6 estimula os hepatócitos a produzir proteínas de fase aguda, tais como a PCR, serum amiloide A, fibrinogênio, hepcidina e α 1-antiquimotripsina, reduzindo a produção de fibronectina, albumina e transferrina. A PCR é um marcador de inflamação e sua síntese é principalmente regulada pela IL6 (TANAKA; KISHIMOTO, 2014).

Figura 7 – Ações da IL6



Fonte: Adaptado de TANAKA; KISHIMOTO, 2016.

A IL8 é uma proteína pequena ligada à heparina que primariamente faz a mediação da ativação e migração de neutrófilos do sangue periférico para o tecido. Estudos sugerem que a IL8 está aumentada na RU ativa comparada àqueles pacientes com tecido colônico normal (MÜZES et al., 2012). Seus níveis séricos também são relacionados à gravidade das alterações endoscópicas e histológicas da RU. A IL8 tem sido considerada um biomarcador viável, intimamente relacionado com a atividade da doença mais do que um biomarcador de patogenicidade (MÜZES et al., 2012).

A IL12 é produzida por antígenos presentes nas células dendríticas e fagócitos. O receptor da IL12 é expreso principalmente nas células T, nas células natural killer e células T natural killer. Essa interleucina medeia o desenvolvimento e a manutenção das células Th1 por induzir a produção de interferon gama (IFN γ) pelas células Th1 e NK, indiretamente ativa a atividade antimicrobiana, antiparasitária e antitumor dos macrófagos e promove a atividade citolítica das células NK. A produção reduzida de IL12 impede a resposta Th1 e aumenta a susceptibilidade às infecções por patógenos intracelulares (MAGYARI et al., 2014). Na DII, a expressão na mucosa da IL12 está aumentada e é relacionada à atividade da doença (MÜZES et al., 2012).

A IL18 é um membro da família da IL1 e seus níveis estão aumentados na mucosa inflamada de pacientes com DC. A IL18 recombinante é capaz de induzir uma resposta proliferativa significativa nos linfócitos da mucosa da DC ativa (LEACH et al., 2008).

A IL9 tem muitas funções, uma delas se relaciona à integridade da barreira epitelial. A sua produção requer a presença de IL4 e TGF β e sua deficiência previne a colite em ratos. A sua adição suprime a cicatrização da mucosa. Também age nos neutrófilos tornando-os resistentes a apoptose. Logo é associada ao déficit de cicatrização da mucosa e tida como um potencial biomarcador de inflamação (CHOY; VISVANATHAN; DE CRUZ, 2017).

A IL10 é uma citocina com múltiplas funções e com marcante ação anti-inflamatória. Vários tipos de células como mastócitos, macrófagos, células dendríticas, monócitos e linfócitos B e T produzem a IL10. A sua função imunorreguladora consiste tanto na diminuição da produção de fatores pró-inflamatórios, o que implica na supressão de fatores como o NF- κ B, como no aumento da produção de fatores anti-inflamatórios. A ação da IL10 se estende para outros setores do sistema imunológico. A IL10 ainda age na inibição da expressão do complexo de histocompatibilidade maior II (MHC classe II) e de seus coestimulantes nos monócitos, macrófagos e células dendríticas. Essa ação provoca a diminuição de citocinas pró-inflamatórias como a IL1, IL6, IL8, IFN α e o TNF α (PAUL; KHARE; GASCHÉ, 2011).

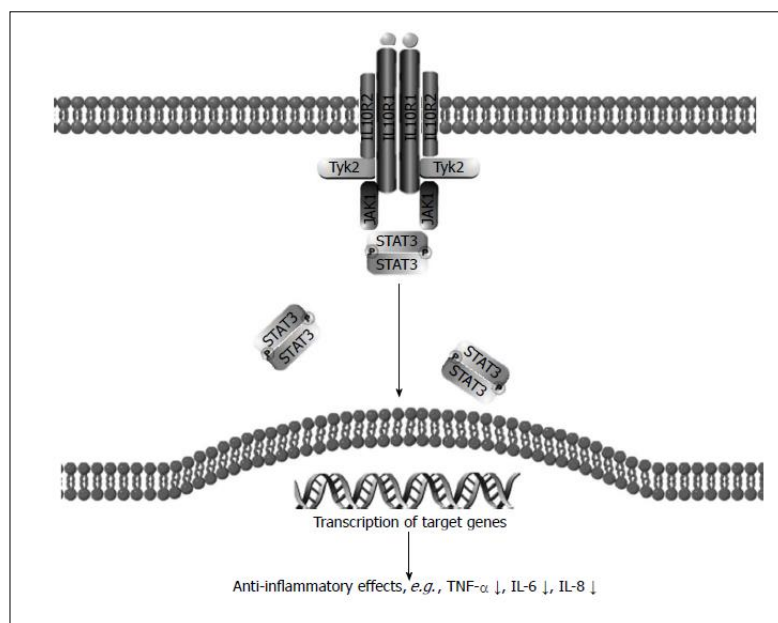
Contudo, a função da IL10 no trato gastrointestinal ainda não está totalmente elucidada. Ainda há questões não respondidas em relação ao seu papel na imunoregulação (YANAGI et al., 2016). Na última década, aumentou o número de publicações que descrevem mutações e alterações no gene e na expressão da IL10 no sistema imunológico gastrointestinal (CORREIA et al., 2009; GLOCKER et al., 2009; GLOCKER et al., 2011; PIGNEUR et al., 2013; RUEMMELE, 2010; YANAGI et al., 2016). A participação da IL10 na patogênese da DII, em especial nos casos de início precoce, ganhou força nos últimos anos, apesar dos relatos de mutações homozigóticas ainda serem raros (GLOCKER; GRIMBACHER, 2012).

As mutações da IL10 resultam em uma sinalização defeituosa. O processo normal começa com a ligação do homodímero da IL10 ao seu receptor (IL10R). O IL10R consiste em um complexo tetramérico composto por duas moléculas de cadeias α (IL10RA) e duas moléculas de cadeias β (IL10RB). Essa ligação ativa a Janus Kinase1 (JAK1) e a tirosina kinase2 (Tyk2) que sofrem autofosforilação e subsequente ativação do IL10R1, recrutando, assim, o transdutor e ativador de sinal de transcrição3 (STAT3), mostrado na Figura 8. A ativação do STAT3 é contraditória na patogênese da DII. A sua relação com a IL10 leva a crer na sua ação anti-

inflamatória, no entanto, o STAT3 pode contribuir para a inflamação em outras células (GLOCKER et al., 2011).

Os polimorfismos genéticos na IL10, no IL10R e no STAT3 são relacionados à patogênica da DII, principalmente nos casos mais graves de colite de início precoce (GLOCKER et al., 2010; GLOCKER et al., 2011; MARLOW et al., 2013). Nesse caso, a patogênica da DII estaria associada a mecanismos anti-inflamatórios defeituosos devido aos polimorfismos da IL10, causando colite com fenótipos agressivos da DII, como o tipo fistulizante (PAUL et al., 2012).

Figura 8 – Mecanismo de sinalização da IL10



Fonte: MARLOW et al., 2013.

2.2.3 Repercussões locais e sistêmicas da inflamação

O paciente portador de DII apresenta alterações inflamatórias características, apesar de não patognômicas. Segundo os critérios de Porto, dados da história clínica, do exame físico, dos exames laboratoriais, dos exames de imagem e da avaliação histológica são necessários para o diagnóstico e acompanhamento desses pacientes (LEVINE et al., 2013). Na RU, a característica mais marcante é a inflamação crônica contínua sem a presença de granuloma e, na DC, é a presença de inflamação crônica focal com ou sem granulomas (LEVINE et al., 2013). As alterações inflamatórias estão relacionadas aos períodos de atividade da DII (GASPARETO; GUARISO, 2013). Segundo Villanacci et al. (2013), essas alterações vistas na mucosa intestinal

do paciente com DII podem ser classificadas em dois tipos de lesões: as anormalidades citoarquiteturais, que consistem no encurtamento e diminuição da densidade das criptas e presença de superfície mucosa irregular, e as lesões inflamatórias, que consistem no aumento das células mononucleares e na presença de granulomas epitelioides (VILLANACCI et al., 2013).

As alterações no SII e no SAI podem levar a alterações no padrão de infiltrado celular e citocinas na mucosa. A resposta inflamatória ativada por estes defeitos produz as lesões de mucosa típicas da DII concentrando células e citocinas inflamatórias. A lesão da mucosa mostra esse arsenal de células e citocinas em grande parte localizado na lâmina própria. Na DII ativa, há um grande infiltrado na lâmina própria de células do sistema imunológico inato, como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e células natural killer e do sistema imune adaptativo, como células B e T. A ativação dessas células leva ao aumento na mucosa de $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, interferon- γ e citocinas da via $\text{IL23-}\text{Th17}$ na DC e RU (ABRAHAM; CHO, 2009; BEGUE et al., 2011, ENGELHARDT et al., 2013).

Os macrófagos são células importantes nesse processo, já que no intestino normal são condicionados a expressar um fenótipo não inflamatório com a inibição dos receptores de imunidade inata e contenção da produção de citocinas pró-inflamatórias. No paciente com DII, os macrófagos apresentam um fenótipo ativado e, junto aos macrófagos recrutados do sangue periférico, expressam o marcador CD14, priorizando a produção de várias citocinas pró-inflamatórias, como a $\text{IL1}\alpha$, $\text{IL1}\beta$ e o $\text{TNF}\alpha$. Nos pacientes com DC, os macrófagos CD14 são aumentados em número e produzem mais IL23 e $\text{TNF}\alpha$, contribuindo para a produção de $\text{INF}\gamma$ pelas células T locais quando comparados com pacientes com RU ou sem DII (SCHIRBEL; FIOCCHI, 2010).

Por sua vez, as células dendríticas são muito envolvidas na iniciação e regulação da resposta imunológica inata local por serem células apresentadoras de antígenos. Sabe-se que na DC as células dendríticas são ativadas e a expressão dos seus receptores microbianos está aumentada, produzindo citocinas pró-inflamatórias como a IL12 e a IL6 . Seu envolvimento com a DII ainda não está muito esclarecido, já que junto aos macrófagos, são células de difícil estudo, além do que as células dendríticas estão em pequena quantidade na mucosa intestinal e têm fenótipos variados (SCHIRBEL; FIOCCHI, 2010).

O acúmulo de neutrófilos na mucosa do intestino é uma alteração comum na DII vista no estudo histopatológico e indica atividade inflamatória da doença, sendo relacionado com o SII. Os neutrófilos podem liberar substâncias com capacidade de danificar o tecido e a sua

associação com dano tecidual indica atividade inflamatória (VILLANACCI et al., 2013). O recrutamento e a adesão dessas células são mediados pela ação de citocinas pró-inflamatórias como a IL1 e o TNF α , levando à manutenção do processo inflamatório. Os vasos sanguíneos intestinais também participam no acúmulo de neutrófilos por falha na regulação da entrada dos leucócitos no tecido (ABRAHAM; CHO, 2009).

No paciente com DII em atividade, a inflamação pode ser detectada em vários níveis e ter diferentes expressões fenotípicas nas manifestações clínicas, nas manifestações laboratoriais, histológicas e moleculares. As evidências inflamatórias nos vários níveis de avaliação do paciente permitem verificar a extensão e a intensidade da doença nos períodos de crises, assim como classificar fenotipicamente cada paciente (LEVINE et al., 2011; LEVINE et al., 2013). A evolução e complicações da DII tanto adulta quanto pediátrica estão intimamente ligadas ao controle ou não da atividade inflamatória da doença (PIGNEUR et al., 2010). O ganho estatural, a normalidade dos exames laboratoriais e endoscópicos, assim como a remissão da inflamação histológica levariam ao controle da doença, o que hipoteticamente deixaria o paciente livre de sintomas e complicações (RUEMMELE et al., 2014; TURNER et al., 2012).

A necessidade de identificação desses períodos leva à discussão sobre os indicadores de atividade inflamatória e seu valor na prática clínica diária. Os sintomas característicos do paciente em atividade inflamatória, os índices de atividade inflamatória, os biomarcadores laboratoriais e moleculares, a avaliação endoscópica e histológica permite o diagnóstico de atividade, mas devem ser avaliados com cautela.

2.2.3.1 Avaliação clínica e por escores

Os sinais e sintomas relacionados à DII são os mais analisados indicadores de atividade inflamatória na prática clínica principalmente na infância, quando os procedimentos invasivos e dolorosos geram questionamento e angústia para os pacientes, para os pais e a para própria equipe de saúde (ZALLOT; PEYRIN-BIROULET, 2013). A atividade inflamatória em adultos é avaliada por meio das manifestações clínicas e vários autores desenvolveram escores para o seu diagnóstico (RICANEK et al., 2011). Em 2007, Turner et al. desenvolveram um escore de atividade inflamatória para a RU em crianças baseado apenas em sinais e sintomas (TURNER et al., 2007). Após avaliar as alterações clínicas e laboratoriais mais frequentes na RU na infância,

enumeraram e criaram notas para essas alterações mediante modelos de regressão, criando, assim, o PUCAI (*Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index*) (TURNER et al., 2007).

O PUCAI avalia dor abdominal, sangramento retal, consistência das fezes, número de evacuações em 24 horas, evacuações noturnas e nível de atividade durante o dia. O total de pontos pode variar de 0 até 85 pontos e o ponto de corte considerado para diferenciar doença ativa e inativa é 10 com sensibilidade de 97% e especificidade de 95%. Dessa forma, a atividade inflamatória é avaliada de forma rápida e a partir de características clínicas (TURNER et al., 2007).

Da mesma forma, existem escores de atividade para avaliar a atividade inflamatória na DC. Na DC pediátrica, o mais conhecido é o PCDAI (*Pediatric Crohn Disease Activity Index*). Este escore foi criado em 1991 e é o mais utilizado desde então (HYAMS et al., 1991). Diferentemente do PUCAI, o PCDAI é um escore que utiliza tanto características clínicas, inclusive relacionadas ao crescimento linear, quanto laboratoriais para indicar atividade inflamatória da DC. Nesse caso, o levantamento dos sinais e sintomas clínicos mostrou que estes não foram suficientes para caracterizar atividade de doença, sendo também necessário considerar os aspectos laboratoriais como nível de hemoglobina e albumina para compor o escore. Tal fato mostra que nem sempre as características clínicas permitem diagnosticar a presença de atividade inflamatória, sendo importante também a realização dos exames laboratoriais (HYAMS et al., 2005).

2.2.3.2 Avaliação complementar da doença inflamatória intestinal na infância

Apesar do desenvolvimento de escores para avaliar a atividade da DII, a busca por biomarcadores que traduzissem a atividade inflamatória com acurácia, boa reprodutibilidade, padronizados e de fácil interpretação, além de alta sensibilidade e especificidade, sempre existiu. Define-se como biomarcador uma entidade que pode ser medida experimentalmente e possa avaliar os processos biológicos normais, processos biológicos patogênicos ou respostas farmacológicas às intervenções terapêuticas (ISKANDAR; CIORBA, 2012).

Na análise da atividade inflamatória da DII, existem vários biomarcadores de fase aguda.

2.2.3.2.1 Marcadores de fase aguda de sangue periférico

As proteínas de fase aguda são definidas como proteínas cuja concentração sérica aumenta ou diminui em mais de 25% como resultado de um processo inflamatório (ISKANDAR; CIORBA, 2012). Em sua grande maioria, é produzida pelo fígado e sua produção é induzida por citocinas que são liberadas por células imunológicas ativadas no local da lesão (ISKANDAR; CIORBA, 2012).

A PCR é um marcador de fase aguda produzida pelos hepatócitos em resposta à IL6, IL1 β e TNF- α , originária de tecidos inflamados, sendo os dois últimos em menor quantidade. O aumento da PCR é rápido, podendo ser em até 1.000 vezes, assim como seu *clearance* é igualmente rápido, durando no máximo 48 horas, em média 19 horas, e determinado pela sua síntese (ISKANDAR; CIORBA, 2012; CIOFFI et al., 2015).

A função da PCR consiste na agregação e opsonização de partículas estranhas pela ativação do sistema complemento, funcionando como um imunomodulador (BALLOU; KUSHNER, 1991; YOUNG; GLEESON; CRIPPS, 1991). Todavia, as doenças virais, as bacterianas, as autoimunes e as neoplasias, ou seja, todas as doenças que resultem em necrose tecidual, podem afetar os níveis séricos da PCR (RICANEK et al., 2011).

Para medir a concentração da PCR sérica, utilizam-se métodos imunonefelométricos ou imunoturbidimétricos seguidos da adição de anticorpos altamente específicos. Esses métodos detectam valores de 3 a 5 mg/L. A PCR de alta sensibilidade detecta valores de 0,1 a 0,3 mg/L, mas seu valor diagnóstico na DII ainda não foi completamente estudado (ISKANDAR; CIORBA, 2012).

Em geral, existem variações genéticas que podem alterar a resposta da PCR. Há também diferenças dos níveis de PCR entre a RU e a DC, sendo os níveis mais altos nesta última (CIOFFI et al., 2015; SIRODOFF et al., 2010). Acredita-se que, como a inflamação na RU é restrita à mucosa com pouca drenagem venosa, há níveis mais baixos de IL6 e consequentemente de PCR. Apesar dessas diferenças, a PCR tem baixa especificidade, não distinguindo entre as duas doenças ou entre colites infecciosas (ISKANDAR; CIORBA, 2012).

Em crianças, há poucos dados sobre a PCR (MÜLLER et al., 2016). Sabe-se que seus níveis podem se elevar em pacientes com atividade inflamatória tanto na DC quanto na RU e publicações, como os critérios de Porto (LEVINE et al., 2013), recomendam seu uso como uma das ferramentas diagnósticas da DII em crianças. Apesar da boa associação da PCR com atividade inflamatória e das recomendações inclusive nos critérios de Porto, recomenda-se a

análise criteriosa das alterações da PCR na DII, principalmente na faixa etária pediátrica (HOEKMAN et al., 2016; MOSLI et al., 2015).

A velocidade de hemossedimentação (VHS) mede a distância em que os eritrócitos caem depois de uma hora em uma coluna vertical de sangue não coagulado e sob a influência da gravidade (CIOFFI et al., 2015). Quando a inflamação está presente, os fatores pró-inflamatórios, como o fibrinogênio, levam à agregação das hemácias e aumento da VHS. Assim, a VHS pode sofrer alterações por influência de proteínas do plasma e do hematócrito. Também sofre influência da idade, sexo, gravidez, anemia e discrasias sanguíneas. A PCR é mais confiável nas primeiras 24 horas, no entanto, a VHS decresce mais lentamente (ISKANDAR; CIORBA, 2012). Em crianças, a VHS é utilizada e faz parte dos critérios do PCDAI (HYAMS et al., 1991).

O aumento das plaquetas correlaciona-se bem com a gravidade da doença e o tamanho das plaquetas é proposto com um bom biomarcador para atividade da doença (CIOFFI et al., 2015; ISKANDAR; CIORBA, 2012). Öztürk et al. (2013) encontraram relação entre o número e morfologia das plaquetas e a atividade da DII em pacientes adultos. No entanto, a relação do número de plaquetas e do tamanho das plaquetas e a atividade inflamatória na DII ainda é alvo de estudos e não há validação da sua utilização em crianças e adultos (ÖZTÜRK et al., 2013).

A albumina é também considerada um biomarcador de fase aguda e diminui durante a inflamação. Uma albumina baixa pode indicar enteropatia perdedora de proteína, usualmente refletindo atividade inflamatória e gravidade da DII e não meramente o *status* nutricional (CIOFFI et al., 2015; LEVINE et al., 2013). Assim como a VHS, é um dos parâmetros do PCDAI e é utilizada tanto no diagnóstico quanto na avaliação da atividade inflamatória da DII em crianças (HYAMS et al., 1991; LEVINE et al., 2013).

Os leucócitos aumentam quando há atividade inflamatória e podem ter o seu número alterado pelos corticoides (aumentam) e imunossupressores como a azatioprina (diminuem) (MUMY; MCCORMICK, 2009). São importantes na avaliação do paciente com doença inflamatória intestinal, principalmente para verificar os sinais de atividade inflamatória. No entanto, há poucas descrições que caracterizem melhor seu comportamento nessa doença.

2.2.3.2.2 Marcadores fecais

Os biomarcadores fecais são importantes por serem específicos do trato gastrointestinal (DIAMANTI et al., 2010). A inflamação é avaliada por meio de produtos provenientes de leucócitos e dos próprios leucócitos que passam pela mucosa inflamada, consequentemente mais permeável, indo para o lúmen intestinal. Apesar do padrão-ouro ser a avaliação desses produtos por meio de leucócitos marcados nas fezes, esse procedimento não é viável na prática médica de rotina. Portanto, os marcadores mais utilizados atualmente são a calprotectina e a lactoferrina, que avaliam a presença dos leucócitos indiretamente (ISKANDAR; CIORBA, 2012). A calprotectina fecal consiste em cerca de 50 a 60% da proteína citosólica dos granulócitos, sendo liberada com a morte dessas células, tornando-se um marcador sensível de inflamação, superior a qualquer marcador para a detecção de inflamação intestinal (KOSTAKIS et al., 2013).

A calprotectina fecal tem sido utilizada como marcador de atividade inflamatória intestinal em crianças, sendo o ponto de corte de 50µg/g (KOSTAKIS et al., 2013; LEVINE et al., 2013). Por ser resistente à degradação por bactérias do lúmen, fica estável nas fezes por vários dias. Tem alta sensibilidade, porém um teste negativo não exclui atividade da doença por ser moderadamente específico (KOMRAUS et al., 2012; KOSTAKIS et al., 2013). Por outro lado, outras doenças podem levar ao aumento da calprotectina fecal como as neoplasias, os pólipos, a enteropatia secundária ao uso de anti-inflamatórios não hormonais, a doença celíaca, a colite microscópica, a colite alérgica e as infecções (ISKANDAR; CIORBA, 2012).

A lactoferrina tem comportamento parecido com a calprotectina como marcador de atividade inflamatória na DII sendo muito sensível, mas pouco específica (LEVINE et al., 2013). No entanto, diferentemente da calprotectina, que se liga a neutrófilos, monócitos e células epiteliais, a lactoferrina é uma glicoproteína que se liga ao ferro somente nos grânulos dos neutrófilos. Com essa ação, tem propriedades antimicrobianas e pode ser utilizada como biomarcador de atividade inflamatória assim como na triagem para o diagnóstico (LEVINE et al., 2013).

A proteína S100A12 tem comportamento similar à calprotectina fecal, porém age ativando o transdutor do NF-κβ aumentando a liberação de citocinas. Apesar da proteína S100A12 ser liberada no soro, o estudo das fezes é mais sensível e específico para DII. Também indicado como biomarcador de atividade inflamatória da DII em adultos e crianças (ISKANDAR; CIORBA, 2012).

A ferritina, $\alpha 1$ -glicoproteína ácida, $\alpha 1$ -antitripsina, transferrina podem ser utilizadas na pediatria, no entanto, ainda não foram avaliadas a sua acurácia, sensibilidade e especificidade na faixa etária pediátrica (ISKANDAR; CIORBA, 2012).

2.2.3.2.3 Avaliação por imagem

As técnicas de enterografia por ressonância nuclear magnética (RNM) e tomografia computadorizada (TC) oferecem possibilidades de detectar inflamação ativa na DC com alta sensibilidade (SIDDIKI; FIDLER, 2009). O que limita a indicação desses procedimentos é a idade dos pacientes (menores de 6 anos necessitam de procedimentos anestésicos o que dificulta a ingestão do contraste), a presença de problemas renais ou alergia a contrastes.

A RNM pode oferecer muitas informações sem a exposição do paciente aos níveis altos de radiação: espessamentos, ulcerações, aumento da vascularização mesentérica (“sinal do pente”), aumento da intensidade do sinal da parede do intestino delgado, inflamação mesentérica, adenopatia reativa e complicações associadas, incluindo perfurações/fístulas e obstrução intestinal (TORKZARD et al., 2012). Já existem padrões utilizados na avaliação dos pacientes adultos e que são extrapolados para crianças que permitem identificar essas alterações e classificá-las como sinal de doença ativa (METZEL et al., 2014).

Ultrassonografia para a DII requer transdutores lineares de alta frequência (5-17 MHz) que fornecem resolução espacial aumentada da parede intestinal, o que é essencial para definir o seu diâmetro e descrever a mucosa. Com aparelhos de alta frequência, ainda é possível analisar a arquitetura da parede intestinal. Com o ultrassom doppler, podem ser obtidas informações da vascularização da parede e extraintestinal que refletem a atividade inflamatória.

Apesar da acessibilidade do seu uso nos pacientes pediátricos, entidades como a ESPGHAN (*European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition*) e a NASPGHAN (*North American Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition*) ainda não recomendam seu uso na prática rotineira para investigar e definir atividade inflamatória da DII em crianças (TURNER et al., 2012; RUEMMELE et al., 2014).

2.2.3.2.4 Avaliação endoscópica

A realização da colonoscopia permite visualizar as lesões associadas à atividade inflamatória da DII, associando aos sintomas do paciente quando apresentados, indicando ou não a presença de atividade de acordo com o aspecto da mucosa. Uma mucosa normal indicaria remissão endoscópica e ausência de atividade inflamatória. A remissão endoscópica baseia-se na cicatrização mucosa, conceito que vem sendo debatido nos últimos anos. A maioria dos estudos define cicatrização mucosa como “ausência de todas as lesões inflamatórias e ulceradas” (DAPERNO et al., 2011; ZALLOT; PEYRIN-BIROULET, 2013).

Portanto, a necessidade de caracterizar a cicatrização mucosa por meio da endoscopia motivou a criação de escores para classificar a existência atividade inflamatória. Existem escores que tentam estabelecer critérios para diferenciar a remissão e a atividade inflamatória nos pacientes com DII. O Grupo de Estudos Terapêuticos das Doenças Inflamatórias do Tubo Digestivo (GTAID) elaborou o CDEIS (*Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity*) incorporando achados endoscópicos que mostraram ter características válidas mediante um modelo de regressão, usando uma avaliação global da gravidade endoscópica como variável dependente. Esse índice foi considerado por ter alta reprodutibilidade e validade, mas é muito complexo. O CDEIS gera notas numéricas que variam entre 0 e 44 e avalia os cinco segmentos intestinais (íleo terminal, cólon direito, cólon transverso, cólon esquerdo/sigmoide e reto) a cada 10 centímetros em relação às seguintes características: 1. Presença ou ausência de úlceras descritas em profundidade; 2. Presença de estenose, classificada como ulcerada ou não ulcerada; 3. Extensão da atividade da doença classificada como ulceração ou só inflamação (MARY; MODIGLIANI, 1989).

Dada a complexidade do CDEIS, Daperno et al. criou uma versão mais simplificada deste índice, SES-CD (*Simplified Endoscopic Activity Score for Crohn's Disease*) (DAPERNO et al., 2011). O SES-CD varia de 0-60 e inclui quatro variáveis: 1. Superfície intestinal atingida por úlceras; 2. Superfície intestinal afetada por outras lesões inflamatórias; 3. Presença de úlceras; 4. Presença de estreitamento (diferenciando como simples ou múltiplas e obstrutivas ou não). Cada variável é pontuada de 0 a 3 e os cinco segmentos são avaliados (íleo terminal, cólon direito, cólon transverso, cólon esquerdo/sigmoide e reto). A presença de úlceras que não são classificadas como profundas e superficiais, mas de acordo com o tamanho – 0,1-0,5 cm; 0,5-2,0 cm; >2,0 cm – e em extensão de superfícies intestinais ulceradas <10%; 10 – 30%; >30% e <50%; 50-75%; >75% (DAPERNO et al., 2004). No entanto, o CDEIS e o SES-CD não

apresentam boa correlação com outros parâmetros de atividade em adultos como o CDAI (*Crohn Disease Activity Index*) (LEWIS, 2011; MONIUSZKO; WIŚNIEWSKA; RYDZEWSKA, 2013).

Os escores utilizados na retocolite ulcerativa também carecem de concordância entre os autores e um dos mais utilizados é o índice de Mayo endoscópico (SEO et al., 1992). Suas notas variam de 0-3, sendo: (0) doença inativa e mucosa normal; (1) doença leve – eritema e friabilidade leve; (2) doença moderada – eritema marcante, ausência de padrão vascular, friabilidade e erosões; (3) doença grave – sangramento espontâneo e ulceração difusa. Limita-se por não caracterizar úlceras superficiais ou profundas (ZALLOT; PEYRIN-BIROULET, 2013).

Ainda não há índices validados para crianças. Utilizam-se índices como o CDEIS ou o SES-CD nessa faixa etária por acreditar-se que não há diferenças significantes das alterações endoscópicas entre adultos e crianças.

2.2.3.2.5 Avaliação histopatológica

A avaliação histológica na DII deve levar em conta as diferentes situações em que o paciente possa se encontrar, como a classificação, DC ou RU, e o uso de medicações, caracterizando a profundidade da lesão, o caráter inflamatório e/ou regenerativo, a presença de granulomas, a formação de fístulas, entre outros. Os medicamentos anti-inflamatórios (ácido 5-acetilsalicílico, corticoesteróides), imunossupressores (azatioprina, metotrexate, ciclosporina, entre outros) e imunomoduladores (anti-TNF α) devem ser sempre considerados devido ao impacto que têm no processo inflamatório e nas manifestações histológicas, podendo modificá-las (LEVINE et al., 2013).

Algumas orientações tentam minimizar essas questões e favorecer uma boa análise da correlação histológica, endoscópica e clínica. Essas orientações vão desde a coleta, onde o número de amostras e o local de retirada são de máxima importância. O patologista deve receber uma quantidade adequada de material do íleo terminal ao reto e essas amostras devem conter dados do paciente, da sua doença e do tratamento recebido (LEVINE et al., 2011; VILLANACCI et al., 2013).

A leitura da lâmina deve conter basicamente duas descrições (VILLANACCI et al., 2013):

1. Características arquiteturais – encurtamento ou duplicação das criptas, diminuição da densidade das criptas e irregularidade da superfície mucosa;

2. Características inflamatórias – aumento transmucosa de células mononucleares da lâmina própria e a presença de granulomas epitelioides.

Existem propostas de escores para avaliação histológica como de Truelove et al., publicada em 1956 (TRUELOVE et al., 1956). Poucas inovações foram propostas desde então e a maioria delas modifica em termos de notas no escore sem trazer modificações em termos de padrão inflamatório, como o escore de Hanauer (HANAUER et al., 1993).

2.2.3.2.6 Avaliação molecular

A resposta imunológica desregulada em indivíduos geneticamente predispostos gera, no tecido acometido, a produção de citocinas e substâncias similares a estas com ação pró-inflamatórias (WANG; DUBOIS; RICHMOND, 2009).

No grande grupo de citocinas já descrito e relacionado com a DII (MAGYARI et al., 2014), destacam-se algumas delas por serem associadas à atividade inflamatória, como a IL6 e o TNF α .

O receptor de IL6 está significativamente aumentado em pacientes com RU e DC ativas comparadas aos pacientes com doença inativa. Os níveis séricos de IL6 e do seu receptor correlacionam-se fortemente com os níveis da PCR, corroborando o seu valor na avaliação da atividade inflamatória da DII (MÜZES et al., 2012).

O TNF α e seu receptor estão aumentados em pacientes com DII, tanto DC como RU, e são considerados como biomarcadores de atividade inflamatória. Seu papel no processo inflamatório da mucosa estimulou o surgimento de medicações anti-TNF α para o tratamento da DII em adultos e crianças. Os membros da família do TNF, como o TNFSF14 (LIGHT), podem ser encontrados na mucosa intestinal e funcionarem como marcadores de atividade da doença. No entanto, as IL6 – tanto os níveis séricos como expressão na mucosa – ainda são alvo de estudo e seu real papel no diagnóstico da atividade da DII ainda não estão definidos (MÜZES et al., 2012).

Um biomarcador para ter uso amplo na prática clínica necessita corresponder a algumas características como as citadas por Boyapati et al. (2016): 1. Identificar indivíduos com riscos de desenvolver a doença; 2. Questionar a grande variação de resposta terapêutica e reações adversas; 3. Inovar classificações capazes de estratificar os pacientes; 4. Poder estratificar os pacientes para ensaios clínicos e ajudar no desenvolvimento de novas terapias; 5. Ter impacto em fatores de

riscos genéticos e ambientais para a doença (BOYAPATI et al., 2016). Portanto, a associação de citocinas, como a IL6 e o TNF α , com o processo inflamatório da DII ainda não encontrou espaço na prática clínica nos pacientes com DII. Como biomarcadores, não assumem o *status* que permitam sua utilização rotineira, sendo seu uso ainda restrito aos procedimentos de pesquisa. Até este momento, apesar da associação com a presença da atividade inflamatória na DII, as interleucinas ainda não são utilizadas de rotina como biomarcadores da inflamação.

2.3 Considerações finais

Os conhecimentos acerca da patogênese e evolução da DII em crianças estão aumentando nos últimos anos. Os marcadores clínicos e laboratoriais já são amplamente utilizados na prática rotineira dos pacientes com DII e servem de apoio tanto para avaliação de novos indicadores quanto para a avaliação diagnóstica e seguimento da doença. A avaliação endoscópica e histológica é ainda alvo de discussão e aperfeiçoamento principalmente visando estabelecer o conceito de remissão profunda na DII. A avaliação molecular surge como uma alternativa próxima da fisiopatologia da DII, mas ainda pouco viável do ponto de vista de assistência.

Com o aumento do conhecimento, surgem novas medidas terapêuticas e propostas diagnósticas. No entanto, há muitas perguntas sem respostas. A utilização de indicadores moleculares de atividade inflamatória encontra-se nesse universo de especulações e ainda sem uma base empírica robusta que corrobore a sua real contribuição na investigação diagnóstica e condução dos pacientes.

A distância entre o conhecimento teórico e o uso na rotina de assistência ainda é grande. Contudo, o uso criterioso dos indicadores validados já existentes e a busca por indicadores mais acurados são grandes passos para o diagnóstico e tratamento das DII.

3 MÉTODOS

Tratou-se de um estudo tipo Série de Casos envolvendo um grupo de crianças e adolescentes com DII – doença de Crohn (DC) e retocolite ulcerativa (RU) – com idade até 17 anos regularmente acompanhados no Ambulatório de Gastroenterologia Pediátrica do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP).

O critério de inclusão foi ter o diagnóstico de DII definido conforme os critérios de Porto revisados (LEVINE et al., 2013). Foram excluídos os pacientes caracterizados como colite indeterminada devido ao pequeno número de casos e possibilidade de falha no diagnóstico.

Os sujeitos do estudo foram subcategorizados ou definidos com o objetivo de melhor analisar as suas particularidades descritas nos itens a seguir.

3.1 Delineamento do estudo

3.1.1 Quanto à idade de aparecimento dos primeiros sintomas

- Forma infantil: pacientes com DC ou RU com início de sintomas antes dos 2 anos de idade.
- Precoce: pacientes com DC ou RU com início dos sintomas entre 2 e 10 anos de idade.
- Tardia: pacientes com DC ou RU com início dos sintomas com mais de 10 anos de idade.

3.1.2 Quanto ao tratamento e à resposta ao corticoesteroides

- Tratamento com imunossupressores – os pacientes que recebiam azatioprina ou metotrexato para o tratamento da DII.
- Tratamento com imunobiológicos – os pacientes que recebiam anticorpo anti-TNF α (infliximabe) para o tratamento da DII.
- Corticodependência – presença de remissão com uso de corticoesteroides, porém com aparecimento de recorrência quando a dose é diminuída; ou quando ocorre após três meses seguidos após a retirada completa dos corticoesteroides; ou, ainda,

se os corticoesteroides não podem ser retirados após o período de 14 a 16 semanas (TURNER et al., 2012).

- Corticorresistência – não ocorrência de resposta ao uso de corticoesteroides após sete a 14 dias (TURNER et al., 2012).

3.1.3 Quanto aos fenótipos clínicos da DC

- Inflamatória – doença inflamatória não complicada sem evidência de doença estenosante ou penetrante (LEVINE et al., 2011).
- Doença estenosante – doença com estreitamento luminal diagnosticado por exames radiológicos, endoscópicos ou em procedimentos cirúrgicos combinados com dilatação pré-estenótica ou sinais ou sintomas de obstrução sem evidências de doença fistulizante (LEVINE et al., 2011).
- Doença penetrante – ocorrência de perfuração intestinal e/ ou fistulas intra-abdominais (LEVINE et al., 2011).
- Doença estenosante/penetrante – presença do fenótipo estenosante e penetrante no mesmo paciente, ao mesmo tempo ou separadamente (LEVINE et al., 2011).
- Doença complicada – pacientes com as formas estenosantes, fistulizantes e/ou com doença perianal (RUEMMELE et al., 2014).

3.1.4 Quanto ao fenótipo clínico da RU

Os pacientes com RU foram classificados quanto ao fenótipo clínico baseados na Classificação de Paris (LEVINE et al., 2011), de acordo com a extensão, variando em E1 a E4 e com a gravidade em S0 ou S1.

3.2 Período e locais do estudo

A avaliação dos dados foi realizada entre julho de 2014 e janeiro de 2016 e a análise molecular, entre julho e novembro de 2016.

Os pacientes foram recrutados e avaliados no IMIP, sendo as análises laboratoriais, endoscópicas e histopatológicas realizadas nesse hospital, no Laboratório de Análises Clínicas,

no Serviço de Endoscopia e no Serviço de Patologia. Os estudos moleculares foram executados no Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (Lika), localizado no campus da UFPE, e no Laboratório de Pesquisa Clínica do Instituto da Criança da Universidade de São Paulo (USP).

O IMIP é um hospital filantrópico de assistência e ensino. A população assistida é composta por indivíduos de baixa condição socioeconômica residentes na região metropolitana e no interior de Pernambuco, mas atende também pacientes dos estados vizinhos. O Ambulatório de Gastroenterologia Pediátrica do IMIP assiste crianças portadoras de DII e, ao lado do Centro de Infusão de Imunobiológicos, é credenciado pelo governo de Pernambuco, sendo referência no estado. O recrutamento e a avaliação dos pacientes do estudo, assim como a análise laboratorial e histopatológica, foram realizados nesse hospital.

O Laboratório de Análises Clínicas, terceirizado pelos Laboratórios Cerpe, atende os pacientes do IMIP tanto em caráter ambulatorial quanto de urgência. Toda análise de atividade inflamatória colhida em sangue periférico dos pacientes foi realizada no Cerpe, de acordo com a rotina dos pacientes recrutados para o estudo.

O Serviço de Endoscopia do IMIP presta assistência a adultos e crianças para realização de endoscopia digestiva alta, colonoscopia e colangiopancreatografia endoscópica retrógrada, além de outros procedimentos realizados por via endoscópica. Esse serviço atende pacientes pediátricos do IMIP para procedimentos eletivos e de urgência, sendo uma das referências no estado de Pernambuco. As biópsias de tecido colônico dos pacientes do estudo foram realizadas nesse setor.

O Serviço de Patologia do IMIP é responsável pela análise histopatológica de todo o material cirúrgico e de outros procedimentos dos pacientes do hospital, incluindo o material proveniente dos procedimentos endoscópicos e as análises das doenças do trato gastrointestinal. As análises histopatológicas das biópsias de tecido colônico foram realizadas nesse serviço.

O Lika possui diversas linhas de pesquisa e, dentre elas, destacam-se aquelas relacionadas ao diagnóstico e à proposição de novos procedimentos terapêuticos. Nesse sentido, o Laboratório atua no desenvolvimento de estratégias de aumento de resolução para diagnósticos em doenças genéticas, agentes infecciosos, doenças adquiridas ou auto-imunes. A equipe do Lika foi responsável pelo armazenamento de material (tecido colônico e sangue), extração e análise de RNA de tecido colônico e extração de DNA de sangue periférico.

O Centro de Pesquisa Clínica do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da USP conta com um laboratório de análises clínicas no qual foi realizado o sequenciamento do DNA dos pacientes do estudo.

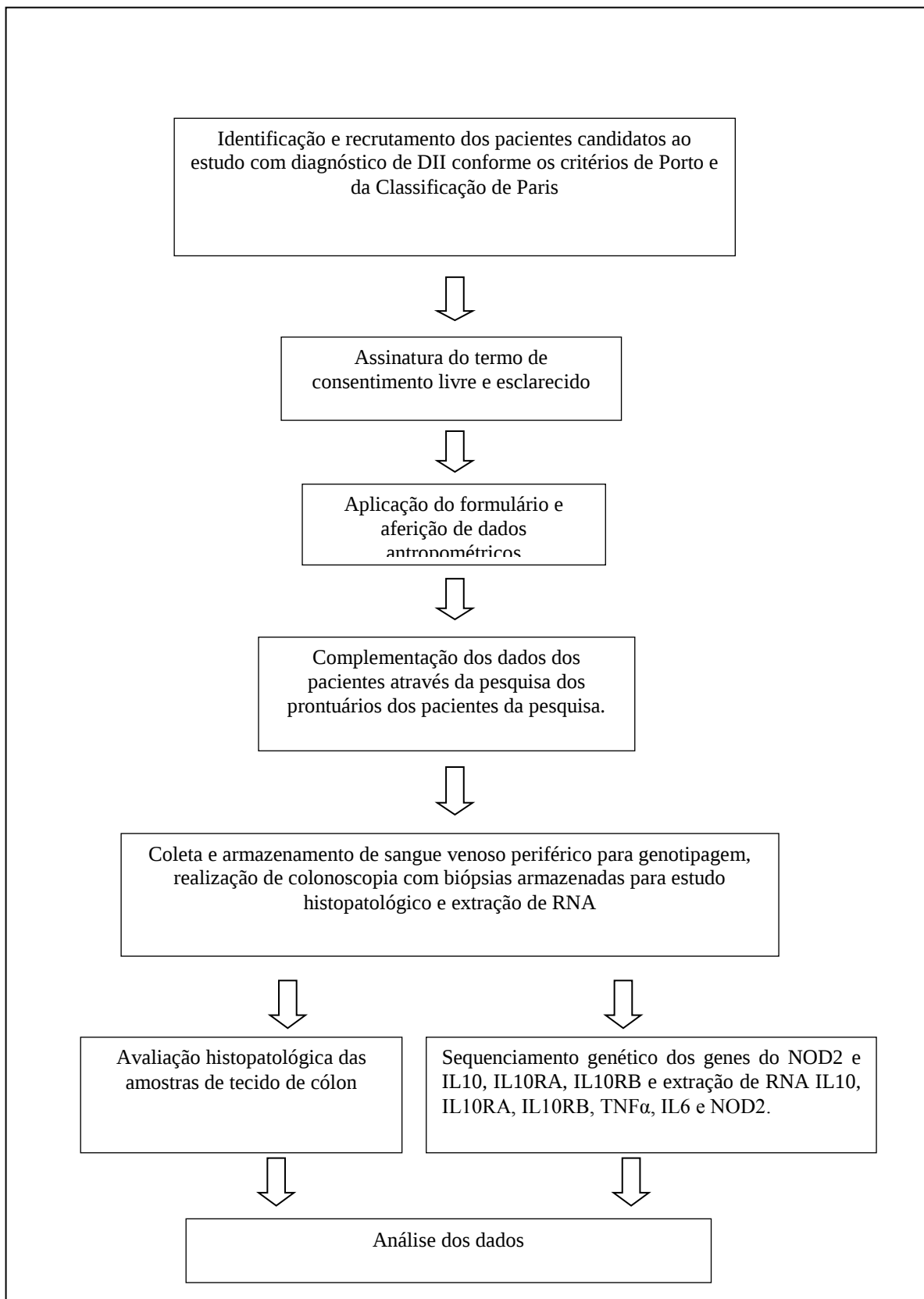
3.3 Definição de termos

O formulário aplicado na entrevista com os responsáveis e os pacientes durante o estudo continha alguns termos que são definidos a seguir:

- Sexo – masculino ou feminino.
- Idade de início – idade na qual os pacientes começaram a apresentar os primeiros sintomas da doença, calculada em meses.
- Idade atual – idade que os pacientes tinham no momento do estudo, calculada em meses.
- Tempo entre início dos sintomas e diagnóstico – tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico, calculado em meses.
- Tempo de acompanhamento no serviço – tempo no qual o paciente foi acompanhado no serviço, calculado em meses.
- Doença familiar – presença ou ausência de doença inflamatória intestinal em parentes de 1º grau.

3.4 Fluxograma de pesquisa

Fluxograma 1 – Fluxograma da pesquisa.



3.5 Dados clínicos

Inicialmente foram revistos todos os prontuários dos pacientes acompanhados no Ambulatório de Gastroenterologia Pediátrica com diagnóstico de doença inflamatória intestinal.

Os dados clínicos foram obtidos por meio de entrevista com os responsáveis e com os pacientes com perguntas contidas em um formulário aplicado para todos os casos do estudo (Apêndice C) e complementado pela revisão dos dados contidos nos prontuários. Durante esse processo, foram avaliadas variáveis demográficas do início da doença e dos sintomas do paciente no momento do estudo.

3.6 Avaliação antropométrica

Os dados antropométricos de peso e altura obtidos no momento do diagnóstico foram colhidos dos prontuários. Os dados antropométricos atuais foram aferidos no momento de aplicação do formulário de pesquisa.

O estado nutricional foi avaliado com base na idade, peso (em quilogramas), comprimento (centímetros) e estatura (centímetros). O exame foi realizado conforme recomendado (GIBSON, 1990). O peso foi mensurado por balanças para bebês e para crianças e adolescentes maiores de 2 anos (Filizola®). O estadiômetro para lactentes foi utilizado para aferir crianças até 2 anos de idade. O estadiômetro de parede (Tonelli Brasil ®) foi utilizado para crianças maiores de 2 anos de idade com a criança descalça e com a coluna e membros inferiores bem retificados. Os índices antropométricos foram calculados e avaliados segundo os programas Anthroplus da OMS (WHO *AnthroPlus* 1.0.4).

Os pacientes foram categorizados do ponto de vista nutricional de acordo com as definições da OMS (WHO, 2006). Os pacientes foram classificados de acordo com as características abaixo do IMC no diagnóstico e no momento do estudo:

- Percentil ≤ 15 – muito baixo peso e baixo peso
- Percentil entre 15 e 85 – eutrofia e risco de sobrepeso
- Percentil ≥ 85 – sobrepeso e obesidade

3.7 Avaliação da atividade inflamatória

3.7.1 Avaliação clínica

As alterações clínicas foram consideradas sugestivas de atividade inflamatória intestinal no momento do estudo quando havia relatos de sinais e/ou sintomas associados à DII em atividade: diarreia, dor abdominal, hematoquezia, melena, febre, perda de peso, baixa estatura, vômitos e/ou despertar noturno. Os pacientes foram categorizados com presença ou ausência de clínica caso apresentassem ou não qualquer um desses sintomas.

3.7.2 Avaliação laboratorial: biomarcadores

Os seguintes exames foram realizados: proteína C-reativa (PCR), velocidade de hemossedimentação (VHS), hemograma e albumina. Esses exames foram considerados marcadores de atividade inflamatória. Foi categorizado como presença de atividade laboratorial quando dois ou mais desses exames apresentavam os seus valores acima do valor de referência do kit utilizado pelo laboratório.

3.7.3 Escores de atividade inflamatória: PUCAI e PCDAI

Os pacientes foram avaliados quanto à presença de atividade inflamatória segundo os índices de PUCAI para RU e PCDAI para DC. Ambos os índices são validados para uso em crianças (HYAMS et al., 2005; TUNER et al., 2007; TUNER et al., 2009). De acordo com esses índices, os pacientes foram classificados em doença em remissão, atividade leve, atividade moderada e grave e foram descritos de acordo com as determinações dos índices de PUCAI e PCDAI (Anexo A e B).

3.7.4 Avaliação endoscópica

A avaliação endoscópica consistia na avaliação da presença ou ausência de achados macroscópicos compatíveis com DII: eritema, granulose, friabilidade, exsudato e úlcera adaptado dos critérios de Porto feita por um observador único (LEVINE et al., 2013). Nos pacientes portadores de DC foram ainda levantadas informações quanto à presença ou ausência de úlceras (aftosas, lineares e/ou serpiginosas), pedra de calcamento e estenose (LEVINE et al., 2013). O achado endoscópico foi categorizado como normal adaptado dos critérios de Porto (LEVINE et al., 2013) – ausência de qualquer das alterações previamente descritas; e alterado – quando houve existência de qualquer das alterações.

3.7.5 Avaliação histopatológica

As informações histopatológicas que definiram a presença ou ausência de atividade microscópica das biópsias provenientes das colonoscopias foram avaliadas segundo os achados considerados relevantes pelos critérios de Porto (LEVINE et al., 2013). Foram registrados os seguintes achados: infiltração neutrofílica, criptite, abscesso de cripta, granuloma, depleção de células caliciformes e distorção de cripta.

Foram considerados como portador de atividade inflamatória histopatológica os indivíduos que apresentavam presença ou ausência de qualquer achado, categorizada como presente ou ausente (Apêndice D).

3.7.6 Biologia molecular

Foi avaliada a expressão no tecido das citocinas IL6, IL10, TNF α . A expressão no tecido foi definida como presente ou ausente.

3.8 Avaliação dos polimorfismos genéticos

3.8.1 Análise DNA

Foi avaliada, em amostras de sangue, a presença de polimorfismos genéticos associados a DII: dos genes do NOD2, da IL10 e dos seus receptores IL10RA e IL10RB (Quadro 1). A avaliação de polimorfismo foi definida como presente ou ausente.

Quadro 4 – Polimorfismos pesquisados e sua descrição

Gene	Descrição
IL10 rs775882367 rs3024493	Gene associado a IL10 Ensembl: DII, retocolite ulcerativa
IL10RA rs2228054 rs2228055	MORAN et al, 2013: associação com colite muito precoce MORAN et al, 2013: associação com colite muito precoce
IL10RB rs1058867	MORAN et al, 2013: associado com aumento do risco de DC
NOD2 rs2066844 rs2066845 rs5743291	Ensembl/Clinvar: DII, susceptibilidade para DII Ensembl/Clinvar: DII, susceptibilidade para DII Ensembl/Clinvar: doença de Crohn

3.8.2 Expressão em tecido colônico

Foi avaliada a expressão em tecido de um fragmento da biópsia colônica do receptor de reconhecimento padrão NOD2 e da IL10 e seus receptores IL10RA e IL10RB. A expressão no tecido foi definida como presente ou ausente.

3.9 Técnicas laboratoriais e endoscópicas

3.9.1 Coleta e armazenamento de material

3.9.1.1 *Sangue*

O paciente foi encaminhado para coleta de sangue no Laboratório de Análises Clínicas do IMIP. Foram coletadas amostras de sangue para realização de exames laboratoriais e avaliação de atividade inflamatória solicitados na rotina do paciente, conforme procedimento habitual do laboratório do IMIP.

A punção e coleta de sangue periférico foram realizadas conforme a rotina adotada pelo laboratório do IMIP para realização de análise de hematologia e bioquímica. Foram também colhidos 2,0 ml em tubo de EDTA (tubos BD Vacutainer®) que, em seguida, foram armazenados em refrigeração com temperatura de 4°C. Esse material foi armazenado a seguir para conservação na temperatura de -80°C no Lika para extração de DNA e análise de DNA descrita a seguir.

3.9.1.2 *Tecido*

As amostras de biópsias de cólon e íleo coletadas durante o procedimento de colonoscopia foram identificadas com o nome do paciente e segmento coletado, armazenadas em formaldeído e encaminhadas para o Serviço de Patologia do IMIP.

As amostras de mucosa de cólon ou íleo que foram provenientes da biópsia realizada durante a colonoscopia foram encaminhadas para a análise molecular. As amostras foram conservadas em *RNAlater®Tissue Collection* (AmbionInc.,USA), em seguida armazenadas a -80°C no Lika.

3.9.1.3 *Exame endoscópico*

Os pacientes foram submetidos à colonoscopia para avaliação de atividade inflamatória no momento do estudo tanto endoscópico, quanto histológico e molecular.

O procedimento de colonoscopia foi realizado com anestesia geral e por um profissional capacitado para realizar endoscopia em crianças e adolescentes no Serviço de Endoscopia do IMIP.

Os dados endoscópicos foram coletados segundo formulário definido para a pesquisa (Apêndice C).

3.9.1.4 Histopatológico

O material para a avaliação histopatológica foi analisado em lâminas confeccionadas no serviço e coradas com hematoxilina-eosina. A análise foi realizada por patologista treinado em análise patológica de trato gastrointestinal.

3.9.1.5 Análise molecular – extração de DNA

A extração de DNA foi realizada no Lika e sequenciamento genético no Laboratório de Análise Clínica do Instituto da Criança da USP, conforme descritos a seguir.

A partir do sangue periférico coletado por punção venosa, o DNA do sangue total foi extraído usando o protocolo padrão do *kit QIAamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen®), tendo sido realizada a genotipagem para polimorfismos do gene NOD2, do gene da IL10 e seus receptores IL10RA e IL10RB.

A genotipagem foi realizada por amplificação da PCR utilizando a sequência de *primers* previamente descritos (LEVINE et al., 2007; BAPTISTA et al., 2008; GLOCKER et al., 2009) e os *kits TaqMan® Assays* (Applied Biosystems®).

As sequências das amostras foram alinhadas ao genoma humano de referência (hg19) utilizando o programa *Burrows-Wheeler Aligner* (BWA). As variantes foram identificadas usando o software *Platypus* (RIMMER et al., 2014) e cada variante única foi avaliada quanto à cobertura e Q-score. As variantes foram anotadas usando a ferramenta ANNOVAR (WANG et al., 2010) e os polimorfismos conhecidos foram identificados usando o dbSNP138 (SHERRY et al., 2001), *1000 genomas Project Consortium* (1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM et al., 2012) e a base de dados *NHLBI Exome Sequencing Project* (ESP). As ferramentas de predição

de danos *in silico* *PhyloP* (SCHWARTZENTRUBER et al, 2012), *SIFT* (KUMAR et al., 2009), *PolyPhen2* (ADZHUBEI et al., 2010), *LRT* (CHUN et al., 2009) e *Mutation Taster* (SCHWARZ et al., 2010) foram utilizadas para prever o impacto de variantes na função da proteína. Também expandimos nossa análise para o banco de dados ClinVar (LANDRUM et al., 2014).

3.9.1.6 Análise molecular – expressão em tecido colônico

As amostras de tecido conservadas em *RNAlater®Tissue Collection* (Ambion Inc.,USA) e armazenadas a -80°C no Lika foram submetidas à extração de RNA tecidual para análise de expressão de IL10, TNF α , IL17A, IL23, IL33, IL6, IL10RA, IL10RB e NOD2.

O RNA total foi extraído de tecidos usando o *kit AllPrep DNA/RNA Mini Kit* (Qiagen®), de acordo com as instruções do fabricante. O transcrito obtido foi quantificado pelo *Nanodrop 2000* (Thermo Scientific®) e transcrito através do *kit Reverse Transcription* (Qiagen®). O PCR quantitativo para IL-6, IL-10, IL10RA, IL10RB, TNF α , IL17A, IL-23, IL33 e NOD2 foram realizados em duplicata a partir de 25 ng de cDNA e primers específicos, utilizando *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems®). As condições de ciclagem de PCR foram 50°C - 2 min, 95°C- 15 min, e 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. Níveis relativos de expressão foram calculados a $2^{Ct_{ubiquitin} - Ct_{gene}}$ onde Ct é o limiar de ciclo, (Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systems) usando RNA do gene ubiquitina como controle endógeno. Os resultados foram apresentados como expressão relativa.

3.2 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa Epi-Info versão 7.1.5. As variáveis quantitativas foram expressas em frequências absoluta e relativa e por mediana, devido à distribuição assimétrica dos valores. As variáveis qualitativas foram descritas em proporções.

Foram aplicados testes estatísticos para comparação de frequências como ANOVA- teste χ^2 - Pearson para os dados de caracterização da amostra. Para a análise comparativa da descrição dos sintomas foi aplicado o χ^2 - Pearson e, para a análise comparativa da presença de atividade inflamatória, foi aplicado o teste de Fisher.

A análise estatística foi realizada pelos pesquisadores envolvidos no projeto e por um bioestatístico no momento da análise de DNA no Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da USP.

Os pacientes inicialmente foram analisados de acordo com a idade de aparecimento dos sintomas nas seguintes categorias:

- Forma infantil: pacientes com DC ou RU com início de sintomas antes dos 2 anos de idade
- Precoce: pacientes com DC ou RU com início dos sintomas entre 2 e 10 anos de idade
- Tardia: pacientes com DC ou RU com início dos sintomas com mais de 10 anos de idade

Algumas análises foram realizadas considerando apenas duas categorias de DC e RU:

- Precoce: pacientes com DC ou RU com início dos sintomas entre 2 e 10 anos de idade
- Tardia: pacientes com DC ou RU com início dos sintomas com mais de 6 anos de idade

3.11 Aspectos éticos

Este estudo seguiu os princípios da Declaração de Helsinque e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do IMIP (CEP-IMIP), com número de parecer 4125-14 e na Plataforma Brasil com o CAAE 30199114.9.0000.5201 em 13/06/2014 (Anexo C). Aos responsáveis pelos pacientes identificados com DII e elegíveis para o estudo, foi explicado o objetivo do estudo e solicitada assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice E). Quando os pacientes eram maiores de 8 anos, foi solicitada também a assinatura do Termo de Assentimento (Apêndice F).

As coletas de sangue nos pacientes foram realizadas por profissionais capacitados (enfermeiro(a)/técnico(a) de enfermagem) e executadas de acordo com as normas de biossegurança e com máximo de cuidado para não causar sofrimento desnecessário aos participantes do estudo, procurando realizar a coleta simultaneamente com os exames de rotina.

Como benefícios diretos, os resultados dos exames foram comunicados aos responsáveis do paciente e incorporados ao prontuário médico para avaliação durante a consulta de rotina.

3.12 Limitações Metodológicas

O estudo apresentou limitações metodológicas que devem ser levadas em consideração durante a leitura dos resultados. Algumas destas limitações são apresentadas a seguir:

- A complexidade da doença dificulta que se observe um padrão quando são analisadas casuísticas pequenas. Isso ressalta a variabilidade observada quanto às formas de apresentação, resposta ao tratamento e importância da análise individualizada para dar sentido aos dados observados;
- As análises de casuística são difíceis de serem comparadas, pois há necessidade de contextualização. Não só as características biológicas da doença, mas fatores socioculturais podem intervir no curso da doença. Apenas modelos epidemiológicos complexos poderiam contribuir para um melhor entendimento do processo;
- Na análise de casuística, diferentes vieses estão presentes e isso deve ser contemplado quando se analisa a validação externa do estudo;
- O delineamento deste tipo de estudo segue a tradição da racionalidade clínica e, muitas vezes, regras do método científico tradicional não são seguidas, o que dificulta a análise da sua validação interna.

4 RESULTADOS

4.1 Características gerais dos pacientes

Foram recrutados 74 pacientes, dos quais 66 preencheram critérios para a inclusão na pesquisa. Oito pacientes foram excluídos por não preencherem adequadamente os critérios para serem diagnosticados como DC ou RU. Dos 66 pacientes incluídos, verificou-se que 37,9% (25/66) tinham diagnóstico de DC e 62,1% (41/66) tinham diagnóstico de RU, sendo 60% (15/25) e 56% (23/41) do sexo masculino, respectivamente. A mediana de idade foi de 120,5 meses, sendo que o grupo de pacientes com DC tinha mediana de idade mais baixa (96 meses) do que o dos pacientes com RU (134 meses). Os pacientes com DC também tiveram início mais precoce dos sintomas, tendo menor mediana de idade de início dos sintomas (12 meses) assim como da mediana de idade do diagnóstico (60 meses), quando comparados aos pacientes de RU.

A maioria dos pacientes era proveniente do interior do estado de Pernambuco, sendo estes 59% (39/66) dos pacientes. Os demais pacientes foram 32% (21/66) da Região Metropolitana do Recife e 9% (6/66) de estados vizinhos do Nordeste (Tabela 1).

Tabela 1 – Características de 66 crianças com diagnóstico de doença inflamatória intestinal, de acordo com os subgrupos etários.

Tipo de DII	DC			RU		
	Infantil	Precoce	Tardio	Infantil	Precoce	Tardio
Idade						
N (%)	14 (56%)	7 (28%)	4 (16%)	8 (19,5%)	27 (65,8%)	6 (14,7)
Idade atual	60,57	111	172	56	90	173
Mediana (variação)	(5-138)	(96-178)	(164-210)	(34-168)	(62-204)	(121-181)
Idade de início dos sintomas						
Mediana (variação)	5,82 (0-19)	42 (24-60)	162,5 (131-168)	9,5 (0-23)	58,5 (24-109)	140 (120-60)
Idade no diagnóstico						
Mediana (variação)	24,43 (4-104)	96 (48-144)	170,5 (131-180)	44,5 (34-108)	60,5 (36-144)	171 (121-80)
Classificação N(%)						
Inflamatória	4 (28,6)	4 (57,1)	2 (50)			
Estenosante	3 (21,4)	1 (14,3)	0	-	-	
Fistulizante	7 (50)	2 (28,6)	2 (50)			
Tempo de acompanhamento						
<6 meses	4 (28,6)	3 (21,4)	2 (50)	2 (25)	0	3 (50)
6-24 meses	2 (14,3)	2 (28,6)	0	0	5 (18,5)	2 (33,3)
24-60 meses	5 (35,7)	0	0	3 (37,5)	13 (43,1)	1 (16,7)
≥60 meses	2 (28,6)	3 (42,8)	2 (50)	3 (37,5)	9 (33,3)	0
PCDAI ou PUCAI * N(%)						
Remissão	6 (42,9)	4 (57,1)	1 (50)	5 (62,5)	22 (81,5)	5 (83,3)
Leve	5 (35,7)	2 (28,6)	2 (50)	2 (25)	2 (7,4)	1 (16,7)
Moderada	1 (7,1)	1 (14,3)	0	1 (12,5)	3 (11,1)	0
Grave	2 (14,3)	0	1 (25)	0	0	0

*PUCAI – *Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index*; PCDAI – *Pediatric Crohn Disease Activity Index*

Dos pacientes classificados como subgrupo Infantil (início dos sintomas antes de 2 anos de idade), oito apresentaram sintomas antes dos 3 meses de idade, destes, seis tinham o diagnóstico de DC e dois de RU.

Os pacientes com DC do subgrupo Infantil apresentaram com mais frequência os tipos fistulizante ou estenosante, somando 71,4% dos casos. Os pacientes com DC do subgrupo Precoce apresentaram predomínio de apresentação do tipo inflamatório (57,1% dos casos) (Tabela 1).

A casuística do estudo foi formada por crianças com diferentes tempos de acompanhamento no serviço, sendo 43/66 (65,1%) dos pacientes tinham mais de dois anos de seguimento. Havia 14 pacientes que estavam sendo acompanhados por menos de seis meses, sendo que dez destes eram acompanhados por menos de três meses após o diagnóstico, ou seja, estavam ainda tratando a atividade inflamatória da doença.

Quando avaliados pelos índices de atividade inflamatória (PUCAI para RU e PCDAI para DC), encontrou-se 65,1% (43/66) dos pacientes em remissão da DII. Entretanto, no subgrupo de pacientes com DC Infantil 57,1% dos pacientes apresentavam atividade inflamatória. O subgrupo que tinha a menor proporção de pacientes em atividade, segundo esses índices, era o de RU com mais de 10 anos, sendo apenas 16,7% dos pacientes.

A Tabela 2 apresenta os sintomas relatados pelos pacientes ou seus responsáveis no início da doença. A diarreia foi o sintoma mais frequentemente relatado tanto na DC quanto na RU. Nos pacientes com DC, acometeu 78,6% dos pacientes da forma Infantil e 100% da Precoce, enquanto que nos pacientes com RU, 75% da forma Infantil e 92,8% da Precoce.

Nos pacientes com DC Infantil, ocorreu comprometimento pondero-estatural em mais da metade das crianças (57,1%) e 42,9% relatou hematoquezia, enquanto que dor abdominal não foi uma queixa frequente. Já a doença perianal chamou atenção por sua frequência superior à frequência descrita entre os portadores de DC. Esse grupo de pacientes, por sua vez, queixou-se de dor abdominal com maior frequência em 81,8% dos casos (81,8% vs 28,67%, $p=0,01$), seguida de comprometimento pondero-estatural em 64%. O comprometimento esteve presente com frequência nos pacientes com DC, chegando a 100% dos casos no subgrupo Tardio. A febre, sintoma pouco frequente nos demais subgrupos, foi observada mais frequentemente no subgrupo de DC Tardio em 50% dos casos (Tabela 2).

Quanto aos portadores de RU, no subgrupo de RU Infantil destaca-se que a hematoquezia foi referida com frequência elevada, em 75% dos casos, igualando-se com a diarreia. Nos subgrupos com RU Precoce e Tardio, a diarreia se destaca como sintoma

frequente, em 92,6% e 60%, respectivamente. A dor abdominal foi mais relatada nos pacientes do subgrupo Tardio, em 80% dos casos (Tabela 2).

Tabela 2 – Descrição dos sintomas iniciais de 66 crianças e adolescentes com doença inflamatória intestinal.

Sintoma N(%)	DC (N= 25)			p [£]	RU (N=41)			p [£]	Total N= 66
	Infantil 14	Precoce 7	Tardia 4		Infantil 8	Precoce 27	Tardia 6		
Diarreia	11 (78,6)	7 (100)	2 (50)	0,134	6 (75)	25(92,6)	3 (60)	0,117	54 (81)
Dor abdominal	4 (28,6)	6 (85,7)	3 (75)	0,029	3 (37,5)	18 (66,7)	4 (80)	0,225	39 (59)
Hematoquezia	6 (42,9)	5 (71,4)	1 (25)	0,281	6 (75)	17 (63)	2 (40)	0,446	38 (58)
Comprometimento pondero-estatural	8 (57,1)	4 (57,1)	4 (100)	0,136	3 (37,5)	12 (44,4)	3 (60)	0,726	31 (47)
Febre	5 (35,7)	3 (42,9)	2 (50)	0,862	3 (37,5)	5 (18,5)	3 (60)	0,126	18 (28)
Comprometimento perianal	11(78,6)	1 (14,3)	3 (75)	0,014	-	-	-		9 (14)

£
(χ^2 - Pearson)

4.1 Estado nutricional

Do ponto de vista nutricional, quando avaliados através do índice de massa corporal (IMC) no momento do diagnóstico e posteriormente no momento do estudo, a maioria dos pacientes apresentou elevação do IMC (Tabela 3). As Figuras 1-4 mostram a evolução de percentil do IMC dos pacientes com DC e RU e seus subgrupos Precoce e Tardio no momento do diagnóstico até o momento do estudo (Figuras 1-4).

No momento do diagnóstico, a condição de eutrofia predominou. Contudo, nos pacientes com DC Precoce, a condição de magreza foi vista mais frequentemente (28% dos pacientes). Já nos pacientes com DC Tardia, foi vista mais a condição de sobrepeso (40% dos casos). Observa-se que, no momento do estudo, nenhum paciente com DC nos subgrupos Precoce e Tardio encontrava-se em condição de magreza, entretanto um paciente com RU Precoce e três pacientes com RU Tardia foram categorizados como magros. Houve uma redução de 44,4% do número absoluto de pacientes com magreza do diagnóstico ao momento do estudo, sendo que esse número caiu de 19 pacientes para dez pacientes.

A evolução do percentil de IMC dos pacientes do diagnóstico de DII até o momento do estudo está apresentada nos Figuras 1 a 4.

Tabela 3 – Estado nutricional de 58 crianças de acordo com o IMC no momento do diagnóstico de doença inflamatória intestinal.

Grupo	DC N(24/25)		RU N(34/41)	
Classificação	Precoce	Tardia	Precoce	Tardia
N(%)	14	10*	6**	28(82,3)***
Muito baixo peso e baixo peso	5 (35,7)	3 (30)	1 (16,7)	10 (35,7)
Eutrofia	8 (57,1)	3 (30)	4 (66,6)	15 (53,5)
Risco de sobrepeso e Sobrepeso	1 (7,2)	4 (40)	1 (16,7)	3 (10,8)
Total	14 (100)	10 (100)	6 (100)	28 (100)

*1 pacientes sem dados antropométricos no diagnóstico que foi estabelecido em outro hospital;

**2 pacientes sem dados antropométricos no diagnóstico que foi estabelecido em outro hospital;

***5 pacientes sem dados antropométricos no diagnóstico.

Gráfico 1 – Evolução do pIMC do diagnóstico ao momento do estudo dos pacientes com DC precoce.

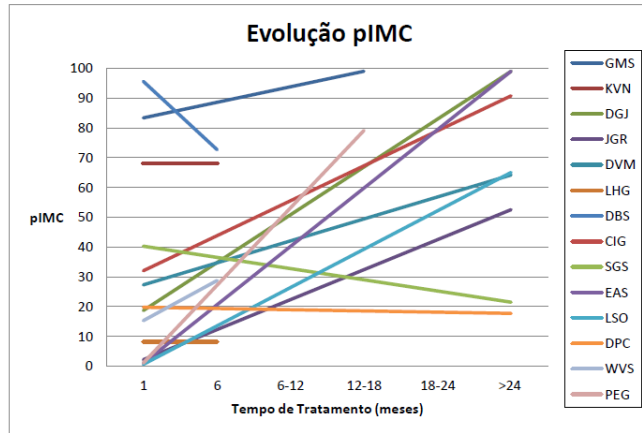


Gráfico 2 – Evolução do pIMC do diagnóstico ao momento do estudo dos pacientes com DC tardia.

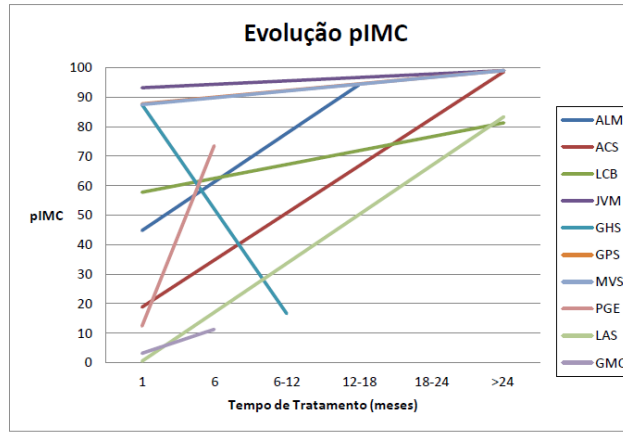


Gráfico 3 – Evolução do pIMC do diagnóstico ao momento do estudo dos pacientes com RN precoce.

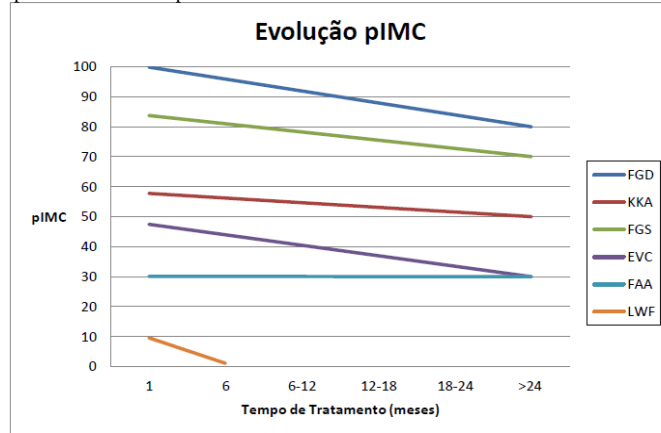
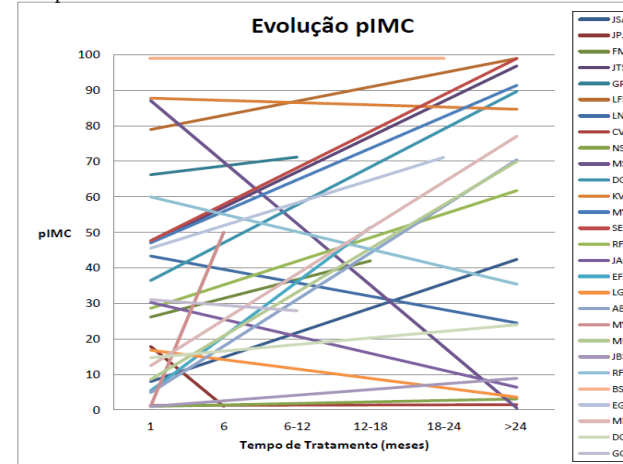


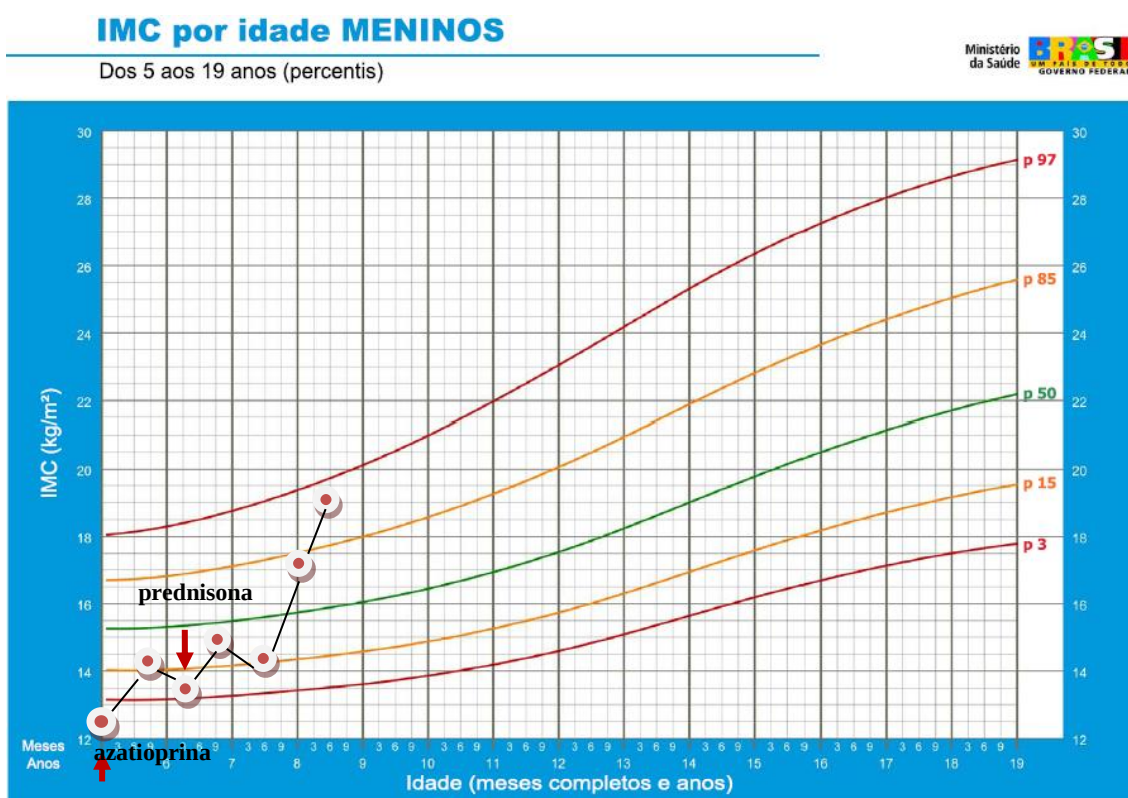
Gráfico 4 – Evolução do pIMC do diagnóstico ao momento do estudo dos pacientes com RN tardia.



4.2.1 Avaliação antropométrica: apresentação de casos

O paciente EAS (Figura 11), sexo masculino, 8 anos e 11 meses, apresentava-se no momento do diagnóstico no percentil de IMC compatível com baixo peso para a idade. O paciente apresentava diagnóstico inicial de DII do tipo colite indeterminada. A mudança para o diagnóstico de DC Precoce do tipo inflamatório foi aos 5 anos de idade com a identificação de granuloma na mucosa colônica. EAS apresentava sintomas desde os 12 meses de vida com sintomas compatíveis com doença agressiva (diarreia intensa e agravo nutricional). Não respondeu à imunossupressão com azatioprina, não sendo possível suspender o corticoide (corticodependente), gerando um ganho de peso excessivo. No momento do estudo, havia iniciado, pouco tempo antes, imunobiológico (infiximabe), estando em desmame da corticoterapia.

Gráfico 5 - IMC de acordo com percentis do paciente EAS (DC precoce) desde o diagnóstico até o momento do estudo.

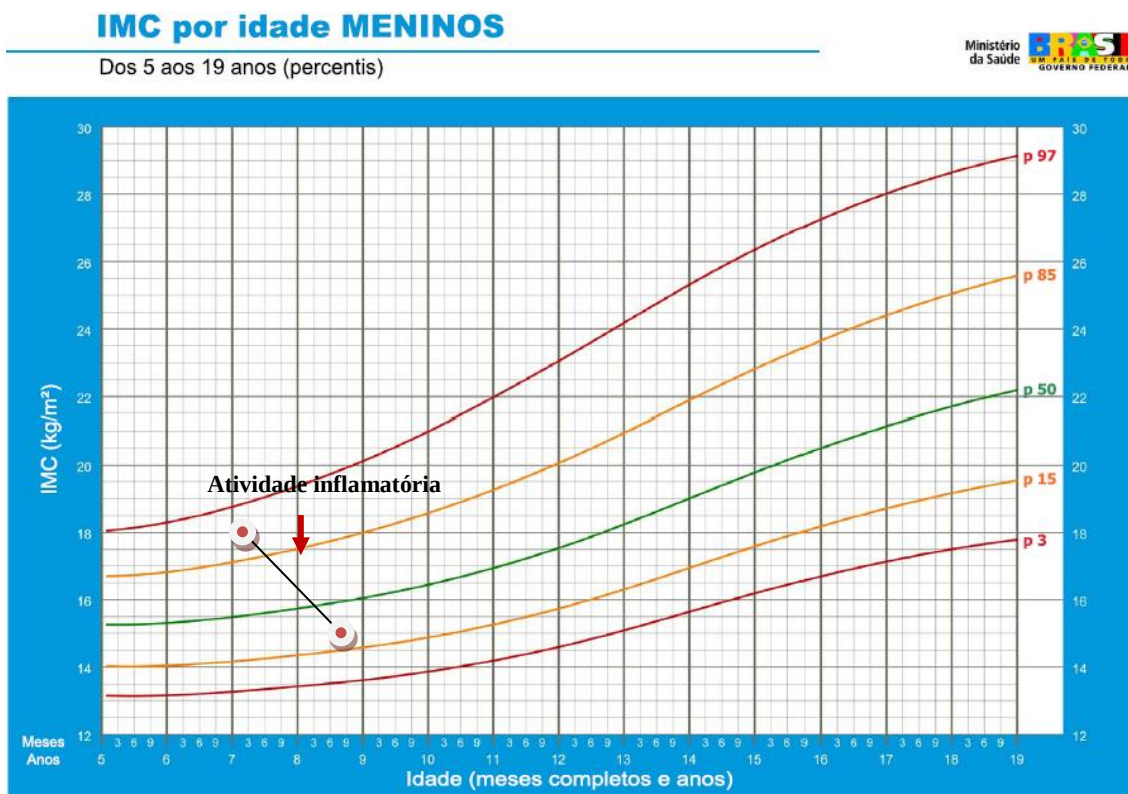


Fonte: WHO Growth reference data for 5-19 years, 2007 (<http://www.who.int/growthref/en/>)

O paciente GHS, sexo masculino, 8 anos, portador de DC Tardia da forma fistulizante apresentou do diagnóstico até o momento do estudo queda do percentil do IMC de 87,5 para 16,47 (Figura 12). O paciente cursou com resistência ao tratamento com corticoesteroides (corticorresistente) e pouca resposta ao tratamento com imunossupressor, a azatioprina. Quando

analisado em relação ao crescimento, apresentava baixa estatura, com queda na velocidade do crescimento no período.

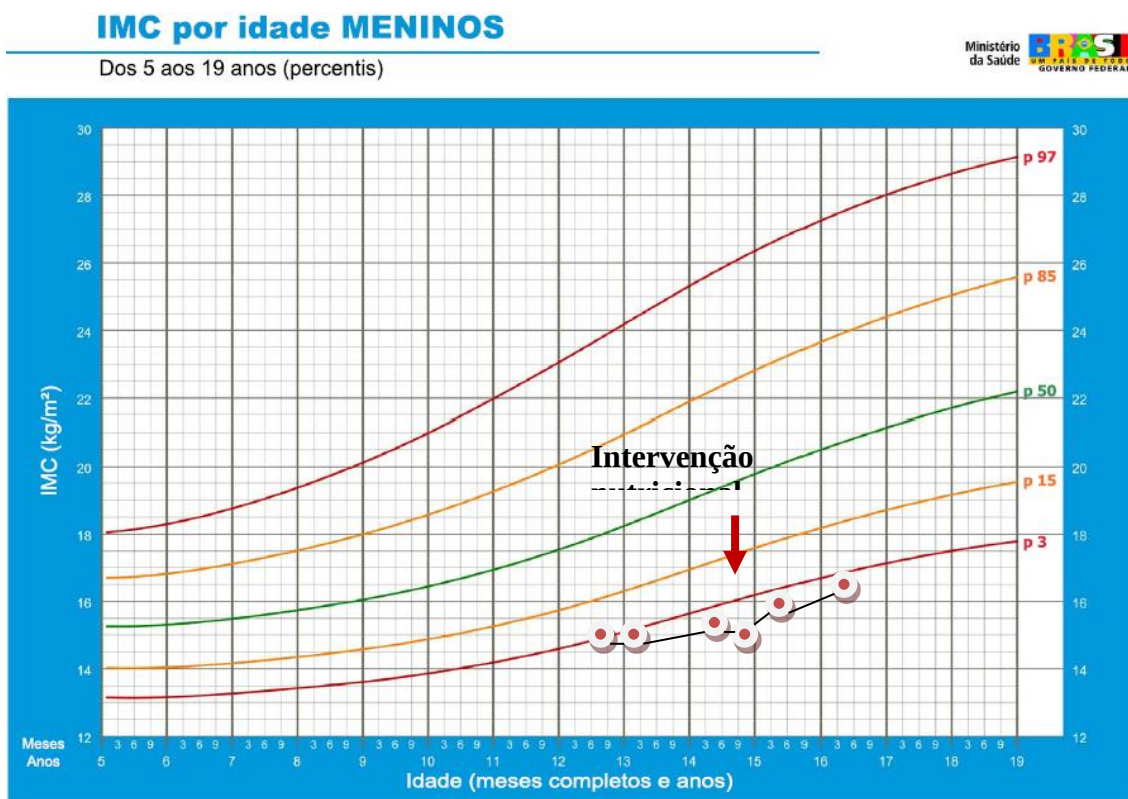
Gráfico 6 - IMC de acordo com percentis do paciente GHS (DC tardia) do diagnóstico até o momento do estudo.



Fonte: WHO Growth reference data for 5-19 years, 2007 (<http://www.who.int/growthref/en/>)

O paciente MSR, sexo masculino, 17 anos, tem diagnóstico de RU tardia desde os 12 anos de idade (Figura 13). Foi instituído o tratamento medicamentoso apropriado para o qual o paciente precisou apenas de monoterapia com azatioprina evoluindo com remissão clínica, laboratorial, endoscópica e histológica. Entretanto, o paciente apresentava baixa aceitação alimentar. Ao longo do tempo de acompanhamento, evoluiu sem melhora do IMC. Após serem excluídas outras possibilidades para a evolução nutricional insatisfatória, concluiu-se que o erro alimentar seria o responsável por tal evolução quando se iniciou, então, um acompanhamento nutricional mais rigoroso aos 15 anos de idade.

Gráfico 7 - IMC de acordo com percentis do paciente MSR do diagnóstico até o momento do estudo.



4.3 Atividade inflamatória

Os escores de atividade inflamatória (PUCAI e PCDAI) foram relatados na Tabela 1. Em ambas as formas da doença, foi verificado que todos os pacientes que apresentaram atividade inflamatória clínica apresentavam também atividade inflamatória endoscópica. Já a atividade inflamatória laboratorial foi verificada em 83,3% dos pacientes com DC e 77,8% dos pacientes com RU com atividade clínica. Os mesmos percentuais são observados ao verificar a ocorrência de atividade inflamatória histológica nas crianças com atividade clínica (Tabela 4).

Tabela 4 – Atividade inflamatória de acordo com a presença de alterações clínica em 36 crianças com doença inflamatória intestinal.

N		DC (13)		p	RU (23)		P
		Clínica presente	Clínica ausente		Clínica presente	Clínica ausente	
Atividade laboratorial	Presente	5 (83,3)	3 (42,9)	0,266	7 (77,8)	0	0,000
N(%)	Normal	1 (16,7)	4 (57,1)		2 (22,2)	14(100)	
Total		6	7		9	14	
Atividade endoscópica	Presente	6 (100)	5 (71,4)	0,462	9 (100)	5 (35,7)	0,003
N(%)	Normal	0	2 (28,6)		0	9 (64,3)	
Total		6	7		9	14	
Atividade Histológica	Presente	5 (83,3)	5 (71,4)	1,00	7 (77,8)	8 (57,1)	0,400
N(%)	Normal	1 (16,7)	2 (28,6)		2 (22,2)	6 (42,9)	
Total		6	7		9	14	

Quando considerados só as alterações de PCR e/ou VHS como atividade laboratorial, a concordância de presença de atividade inflamatória clínica e as alterações destes marcadores foi de 83,3% para os pacientes com DC e 66,7% para os pacientes com RU. Essa correspondência foi próxima à encontrada entre a atividade inflamatória laboratorial e atividade inflamatória clínica da Tabela 4.

Na avaliação isolada da PCR e a presença de clínica, verificou-se a concordância entre o aumento da PCR e da presença de clínica em 83,3% dos pacientes com DC e 40% dos pacientes com RU. Na avaliação da VHS, a concordância do aumento desta com a presença de clínica foi também de 83,3% dos pacientes com DC e 60% dos pacientes com RU (Tabela 6).

No Quadro 5, há a descrição de um grupo de pacientes com DC no qual foi realizada a avaliação de atividade inflamatória do ponto de vista de presença de sinais e sintomas clínicos, da atividade laboratorial, da atividade endoscópica e histológica. No mesmo quadro, foram descritos também os valores de expressão de RNA no tecido colônico do $TNF\alpha$, IL6 – citocinas pró-inflamatórias IL10 – citocinas anti-inflamatória. No Quadro 6, há a mesma descrição para os pacientes com RU.

Tabela 5 – Atividade inflamatória laboratorial (PCR e VHS), atividade inflamatória endoscópica e atividade histológica em relação à presença ou ausência de sintomas (clínica).

N		DC 13		p	RU 23		p
		Clínica presente	Clínica negativa		Clínica presente	Clínica negativa	
PCR e/ou VHS	Presente	5 (83,3)	4 (57,1)	0,559	6 (66,7)	2 (14,3)	0,023
	Normal	1 (16,7)	3 (42,9)		3 (33,3)	12 (85,7)	
	Total	6	7		9	14	
Atividade endoscópica	Presente	6 (100)	5 (71,4)	0,462	9 (100)	5 (35,7)	0,003
	Normal	0	2 (28,6)		0	9 (64,3)	
	Total	6	7		9	14	
Atividade histológica	Presente	5 (83,3)	5 (71,4)	1,00	7 (77,8)	8 (57,1)	0,400
	Normal	1 (16,7)	2 (28,6)		2 (22,2)	6 (42,9)	
	Total	6	7		9	14	

P<0,05(Fisher)

Tabela 6 – Atividade inflamatória laboratorial (PCR e VHS) em relação à presença ou ausência de sintomas (clínica).

N(%)		DC (13)*		p	RU (25)*		p
		Clínica presente	Clínica ausente		Clinica presente	Clinica ausente	
PCR	Elevada	5 (83,3)	3 (42,9)	0,266	4 (40)	1 (6,7)	0,121
	Normal	1 (16,7)	4 (57,1)		6 (60)	14 (93,3)	
Total		6	7		10	15	
VHS	Elevada	5 (83,3)	2 (28,6)	0,103	6 (60)	1 (6,7)	0,007
	Normal	1 (16,7)	5 (71,4)		4 (40)	14 (93,3)	
Total		6	7		10	15	

*16 pacientes sem dados laboratoriais; p<0,05 (Fisher)

Quadro 5 – Atividade inflamatória clínica, laboratorial, endoscópica e histopatológica e a expressão em tecido de TNF α , IL6 e IL10 de pacientes com DC.

Paciente	Tipo	Atividade clínica	Atividade laboratorial	Atividade endoscópica	Atividade histológica	TNF α	IL6	IL10	TNF α /IL10	IL6/IL10
DPC	Precoce	Sim	Sim	Sim	Sim	27,6	7,6	5,5	5,0	1,3
WVS	Precoce	Sim	Sim	Sim	Sim	7,1	3,2	2,2	3,2	1,4
JGR	Precoce	Sim	Não	Sim	Sim	22,5	395,1	9,1	2,5	158,4
GMS	Precoce	Sim	Não	Sim	Sim	2,9	0,6	1,0	2,9	0,6
DGJ	Precoce	Sim	Não	Sim	Não	6,7	1,8	2,4	2,8	0,7
KVN	Precoce	Não	Não	Não	Sim	6,3	1,3	1,5	4,2	0,8
CIG	Precoce	Não	Não	Não	Sim	7,9	1,6	3,0	2,6	0,5
LHG	Precoce	Não	Sim	Não	Não	3,8	0,6	2,2	1,7	0,2
PGE	Tardia	Sim	Sim	Sim	Sim	55,6	223,7	31,4	1,7	7,12
ALM	Tardia	Sim	Não	Não	Não	3,6	0,2	4,2	0,8	0,04
ACS	Tardia	Não	Sim	Sim	Sim	4,8	2,9	1,3	3,7	2,2
LCB	Tardia	Não	Sim	Sim	Sim	4,4	4,8	2,3	1,9	2,0

Cinco pacientes do estudo são descritos a seguir para ilustrar a presença de atividade inflamatória no momento do estudo desde a avaliação da atividade inflamatória do ponto de vista clínico até a avaliação da atividade inflamatória do ponto de vista molecular. Destaca-se o diagnóstico, o tipo de apresentação quanto ao tempo e quanto ao fenótipo da doença, o tratamento recebido e as alterações encontradas relacionadas à atividade inflamatória.

A paciente DPC, 12 anos e 4 meses, sexo feminino, com diagnóstico de DC Precoce do tipo fistulizante estava em tratamento de manutenção com azatioprina na dose de 2,5mg/kg/dia e infliximabe na dose de 5mg/kg/dia (Quadro 5). A paciente em questão tinha queixas como diarreia, despertar noturno, hematoquezia e perda de peso, o índice PCDAI foi 30 e os valores de PCR foi 38,2 e VHS 38. Não houve aparecimento de novas fístulas. Na avaliação endoscópica apresentou pancolite erosiva em atividade com eritema, friabilidade, úlceras lineares. A avaliação histopatológica mostrou presença de neutrófilos. A expressão na mucosa de cólon de TNF α , IL6 e IL10 se mostrou elevada, sendo a relação entre o TNF α e a IL10 elevada em relação aos outros pacientes.

O paciente JGR, 7 anos, sexo masculino, com diagnóstico de DC Precoce do tipo inflamatória estava em atividade inflamatória no momento do estudo (Quadro 5). Apesar de estar em uso de azatioprina na dose de 2,5 mg/kg/dia, iniciou quadro de perda ponderal e parada no crescimento. O índice de atividade inflamatória PCDAI foi cinco, apresentava PCR 17,8 e VHS 12. A avaliação endoscópica mostrou presença de pancolite ativa com úlceras lineares, retificação e presença de pseudopólipos. O estudo histopatológico mostrou depleção das células caliciformes. O paciente foi encaminhado para a triagem para uso de imunobiológico, infliximabe devido à falha na terapia de manutenção com azatioprina apesar de adequação da dose. Houve aumento da expressão em tecido colônico de TNF α , IL6 e IL10, sendo a relação de IL6 com a IL10 mais elevada em relação aos outros pacientes.

O paciente PGE, 13 anos e 8 meses, sexo masculino, com diagnóstico de DC Tardia do tipo inflamatória, tinha diagnóstico recente recebendo nutrição enteral exclusiva e azatioprina na dose 1 mg/kg/dia. Na avaliação inicial desse paciente, apresentava PCDAI de 85, tinha queixas de perda de peso, dor abdominal, febre e episódios de diarreia. O PCR era de 59,4 e VHS 26. A avaliação endoscópica mostrou colite intensa direita com eritema, friabilidade, úlceras lineares e aftas. O histopatológico mostrou presença de neutrófilos. Diferentemente dos outros pacientes acima relatados, o paciente PGE apresentou aumento de TNF α , IL6 e IL10, porém manteve a relação IL6/IL10 e TNF α /IL10 sem elevações importantes em relação aos outros pacientes.

O paciente JSA, 9 anos e 4 meses, sexo masculino, com diagnóstico de RU Tardia e pioderma gangrenoso, faz uso de mesalazina. Apresentava piora das lesões do pioderma gangrenoso em membros. No momento do estudo, apresentava PUCAI 0 e sua única queixa era o aumento das lesões do pioderma gangrenoso. No entanto, a avaliação laboratorial mostrou PCR 9,7 e VHS 70. A endoscopia mostrou pancolite erosiva ativa e o histopatológico apontou presença de neutrófilos, criptite, depleção de células caliciformes e distorção de arquitetura. A expressão colônica de citocinas TNF α , IL6 e IL10, assim como a relação entre o TNF α com a IL10 e a IL6 com a IL10, não se mostrou elevada em relação aos outros pacientes com atividade.

A paciente FMS, 14 anos e 3 meses, sexo feminino, com diagnóstico de RU Tardia em uso de mesalazina. No momento do estudo, apresentava diarreia, despertar noturno e episódios de hematoquezia. A avaliação do PUCAI resultou em 20 pontos. O valor da PCR foi de 0,3 e o de VHS, de 36. Na endoscopia havia pancolite erosiva ativa e, no histopatológico, havia presença de neutrofilia e distorção de criptas. Os valores da expressão colônica de TNF α , IL6 e IL10 foram mais elevados em relação aos outros pacientes e a relação entre a IL6 e a IL10 estava aumentada em relação aos outros pacientes avaliados.

Quadro 6 - Atividade inflamatória clínica, laboratorial, endoscópica e histopatológica e a expressão em tecido de TNF α , IL6 e IL10 de pacientes com RU.

Paciente	Tipo	Atividade clínica	Atividade laboratorial	Atividade endoscópica	Atividade histológica	TNF α	IL6	IL10	TNF α /IL10	IL6/IL10
CG	Precoce	Sim	Sim	Sim	Sim	7,1	2	3,5	2,0	1,0
KKA	Precoce	Sim	Não	Não	Não	1.7	0.1	1.1	1,5	0,09
EVC	Precoce	Não	Não	Sim	Sim	6,0	2,3	3,1	1,9	0,7
FAA	Precoce	Não	Não	Não	Sim	2.1	2.7	0.7	3	3,8
FGD	Precoce	Não	Não	Não	Sim	8.1	1.2	1.0	8,1	1,2
HLS	Precoce	Não	Não	Não	Não	2.6	0.2	1.4	1,8	0,1
JSA *	Tardia	Sim	Sim	Sim	Sim	10.4	1.4	2.0	5,2	0,7
JPJ	Tardia	Sim	Sim	Sim	Sim	4.8	4.5	1.4	3,4	3,2
GRS***	Tardia	Sim	Sim	Sim	Sim	5.6	27.1	3.7	1,5	7,3
LNP	Tardia	Sim	Sim	Sim	Sim	8,1	1,7	5,1	1,5	0,3
FMS**	Tardia	Sim	Não	Sim	Sim	6.9	60.3	2.9	2,3	20,7
KVL	Tardia	Sim	Não	Sim	Sim	5,7	4,3	4	1,4	1,0
MVL	Tardia	Sim	Não	Não	Sim	5,3	1	2,7	1,9	0,3
JTS	Tardia	Não	Não	Sim	Sim	3.8	5.2	0.4	9,5	13
JCG	Tardia	Não	Não	Não	Sim	3,7	2,5	3,2	1,1	0,7
SEG	Tardia	Não	Não	Não	Sim	1,5	0,1	2	0,7	0,05
RFS	Tardia	Não	Não	Sim	Não	7,1	1,7	3	2,3	0,5
LGS	Tardia	Não	-	Sim	-	5,5	0,8	4,4	1,2	0,18
LFS	Tardia	Não	Não	Não	Não	2.2	2.1	0.7	3,1	3
GGA	Tardia	Não	Não	Não	Não	2,4	0,4	2,4	1,0	0,1
MSR	Tardia	Não	Não	Não	Não	6,2	0,6	3,8	1,6	0,1
DCO	Tardia	Não	Não	Não	Não	9	1	2,7	3,3	0,3
JAQ	Tardia	Não	-	-	-	10	2,9	4,6	2,1	0,6
EFA	Tardia	Não	-	Não	-	2,5	0,4	2	1,2	0,2

4.4 Polimorfismos genéticos

Foi possível avaliar a presença de polimorfismos para os genes da IL10, dos receptores da IL10 (IL10RA e IL10R) e do NOD2, em apenas 49/66 pacientes. Em 35 foram encontrados polimorfismos associados à DII (Quadros 6 e 7). A Tabela 7 apresenta a distribuição e frequência desses polimorfismos encontrados nos pacientes analisados.

4.4.1 Presença de polimorfismos dos receptores da IL10RA e do RRP NOD2: apresentação de casos

O paciente DVM, 7 anos e 7 meses, sexo masculino, teve início dos sintomas aos 11 meses de idade com diagnóstico DC do tipo inflamatória e apresentou comprometimento perianal a partir de 1 ano de idade. Apresentou resistência ao tratamento com corticoide e reaparecimento da atividade inflamatória. Não há comprometimento pondero-estatural. Recebeu azatioprina para manutenção do tratamento e corticoterapia nos períodos de atividade. Em processo de avaliação para início de imunobiológico. A análise de DNA identificou dois polimorfismos do receptor de IL10 (IL10RA) associados à colite de início muito precoce.

O paciente DGJ, 7 anos e 2 meses, sexo masculino, teve início dos sintomas aos 3 meses de idade e diagnóstico de DC do tipo estenosante aos 7 meses de vida. Apresentava ainda pneumonia de repetição, granuloma oral, doença perianal, baixa estatura. Era dependente do tratamento com corticoide. No momento do estudo, recebia azatioprina, corticoide oral (prednisona) e imunobiológico a cada seis semanas sem boa resposta. Mantém períodos frequentes de atividade da doença, necessitando ajustar a dose do imunobiológico e com dificuldade em manter-se sem corticoterapia. A análise de DNA identificou um polimorfismo do receptor de IL10 (IL10RB), porém sem descrição encontrada sobre seu valor em relação ao fenótipo e ao seu significado clínico. No entanto, foi encontrado polimorfismo NOD2 (rs1861759). Esse polimorfismo está associado com a DC.

Tabela 7 – Pacientes com DC e RU precoce e tardia e distribuição dos polimorfismos apresentados.

Polimorfismo	DC – pacientes		RU – pacientes		Total N(%)	Fenótipo esperado
	N (21)		N(18)			
	Precoce	tardia	precoce	Tardia		
IL10						
rs775882347	1	0	0	0	1 (2,5)	Sem descrição para DII
rs3024493	3	1	2	3	9 (23)	Associação com DII, RU
rs3024492	0	0	1	2	3 (7,6)	Sem descrição para DII
rs3024508	0	0	0	1	1 (2,5)	Sem descrição para DII
rs6697497	0	0	1	1	2 (5,0)	Sem descrição para DII
rs9282739	0	0	1	1	2 (5,0)	Sem descrição para DII
rs3024496	0	0	1	0	1 (2,5)	Sem descrição para DII
rs78082264	0	0	1	0	1 (2,5)	Sem descrição para DII
rs3024509	0	0	1	0	1 (2,5)	Sem descrição para DII
IL10RA						
rs2228054	1	0	4	1	6 (15,3)	Risco aumentado para DC e DII precoces
rs2228055	1	0	4	1	6 (15,3)	Risco aumentado para DC e DII precoces
rs10892202	2	0	2	2	6 (15,3)	Protetor para DII
rs4252249	3	0	4	3	10 (25)	Protetor para DII
rs4252270	3	0	3	2	8 (20,5)	Protetor para DII
IL10RB						
rs8178561	0	0	2	1	3 (7,6)	Protetor para DII
rs1058867	1	1	4	0	6 (15,3)	Associação com risco aumentado de DC
NOD2						
rs104895431	1	0	0	0	1 (2,5)	Sem descrição para DII
rs104895444	1	0	0	0	1 (2,5)	Sem descrição para DII
rs2066844	1	0	2	0	3 (7,6)	Susceptibilidade para DII, DC
rs2066845	2	0	0	0	2 (5,0)	Susceptibilidade para DII, DC
rs2066842	3	3	1	5	11 (28,2)	DC
rs2066843	3	0	0	2	5 (12,8)	Susceptibilidade para DII, DC
rs1861759	4	1	1	2	8 (20,5)	DC
rs5743289	4	0	0	2	6 (15,3)	Susceptibilidade para DC, DC com possibilidade cirúrgica, inflamação de intestino grosso
rs2076756	4	1	0	2	7 (17,9)	Susceptibilidade para DC, DC com possibilidade cirúrgica, inflamação de intestino grosso
rs5743291	2	1	1	3	8 (20,5)	DC

Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos, contudo, percebe-se que a maioria dos pacientes que não tinha doença perianal ou doença fistulizante não apresentava os polimorfismos testados. Na tabela 8, é descrita a ocorrência dos polimorfismos e sua “concordância” com a presença de doença perianal. Nos pacientes com DC Tardia, mais de 75% dos casos que tinham doença perianal ou doença fistulizante não tinham polimorfismos dos genes (Tabela 8).

Nos Quadros 7 e 8, estão listados os pacientes com DC e RU, respectivamente, com o tratamento recebido, o fenótipo clínico apresentado, a evolução para cirurgia ou não, o polimorfismo encontrado e o fenótipo associado com esse polimorfismo de acordo com a literatura. Além do valor encontrado da expressão de RNA em tecido colônico da IL10, IL10RA, IL10RB, TNF α , NOD2. Em alguns pacientes com DC, como DPC, PGE e YM, não se encontrou uma definição mais específica entre os fenótipos encontrados e os esperados para o polimorfismo apresentado por esses pacientes. Nos pacientes com RU, o mesmo aconteceu com mais frequência, visto que muitos pacientes (8/17) apresentaram polimorfismos do NOD2 que têm pouca associação com a RU.

Nos Apêndices 5 e 6, estão descritos os pacientes com DC e RU, respectivamente, e suas características clínicas, tratamento, presença de atividade inflamatória, polimorfismo apresentado e expressão no tecido colônico de interleucinas anti e pró-inflamatórias e do NOD2.

Tabela 8 – Presença de doença perianal e doença fistulizante em pacientes com polimorfismos de IL10, IL10RA, IL10RB e NOD2.

Polimorfismo		Manifestação clínica											
		Doença perianal						Doença fistulizante					
		DC Infantil (14)		p	DC Tardia (9)		P	DC Infantil (14)		p	DC Tardia (9)		p
		Presente	Ausente		Presente	Ausente		Presente	Ausente		Presente	Ausente	
IL10 N(%)	Presente	3 (27,3)	1 (33,3)	1,00	1 (25)	3 (28,6)	1,00	2 (28,6)	2 (28,6)	1,00	1 (25)	2 (28,6)	1,00
	Ausente	7 (77,8)	2 (66,7)		3 (75)	3 (71,4)		5 (71,4)	5 (71,4)		3 (75)	5 (71,4)	
	Total	11	3		4	7		7	7		4	7	
IL10RA N(%)	Presente	4 (36,4)	0	0,50	1 (25)	3 (42,9)	1,00	2 (28,6)	2 (28,6)	1,00	1 (25)	3 (42,9)	1,00
	Ausente	5 (63,6)	3 (100)		3 (75)	3 (57,1)		5 (71,4)	5 (71,4)		3 (75)	4 (57,1)	
	Total	11	3		4	7		7	7		1	7	
IL10RB N(%)	Presente	0	1 (33,3)	0,21	0	1 (14,3)	1,00	0	1 (14,3)	1,00	0	1 (14,3)	1,00
	Ausente	11 (100)	2 (66,7)		4 (100)	5 (85,7)		7 (100)	5 (85,7)		4 (100)	6 (85,7)	
	Total	11	3		4	7		7	7		4	7	
NOD2 N(%)	Presente	6 (54,5)	2 (66,7)	1,00	1 (25)	3 (42,9)	1,00	4 (57,1)	4 (57,1)	1,00	1 (25)	3 (42,9)	1,00
	Ausente	3 (45,5)	2 (33,3)		1 (75)	3 (57,1)		3 (42,9)	2 (42,9)		3 (75)	4 (57,1)	
	Total	9	4		2	6		7	6		4	7	

Quadro 7 – Pacientes com DC avaliados quanto à presença de polimorfismos genéticos da IL10 e seus receptores e o NOD2, os fenótipos apresentados, os fenótipos esperados e a expressão de IL10 e de seus receptores e do NOD2.

Paciente	Sexo	Tratamento	Fenótipo apresentado	Cirurgia	Polimorfismo	Fenótipo esperado	IL10	IL10RA	IL10RB	NOD2
GMS	M	MTX-C	Fistulizante, perianal, corticodependente, precoce	Não	IL10 – rs3024493	Associação com DII, RU	1,0	9,5	32778,0	2,0
JGR	M	AZA	Inflamatória, granuloma em cólon, precoce	Não	NOD2 – rs2066842 rs2066843 rs2076756	DC Susceptibilidade para DII, DC Susceptibilidade para DII, DC com possibilidade cirúrgica, inflamação de intestino grosso				
DVM	M	A	Inflamatória, perianal, corticorresistente, precoce	Não	IL10RA- rs2228054 rs2228055	Risco aumentado para DC precoce e DII muito precoce Risco aumentado para DC precoce e DII muito precoce	-	-	-	-
LHG	M	A	Inflamatória, perianal, precoce	Não	IL10RA – rs10892202 rs4252249 rs4252270 NOD2 – rs1861759 rs5743291	Proteção para DII Proteção para DII Proteção para DII DC DC	2,2	11	28324,9	2
KVN	F	A	Fistulizante, precoce	Sim	NOD2 – rs2066844 rs5743289 rs2076756	Susceptibilidade para DII, DC Susceptibilidade para DII, DC com possibilidade cirúrgica, inflamação de intestino grosso Susceptibilidade para DII, DC com possibilidade cirúrgica, inflamação de intestino grosso	1,5	15,5	19679,9	1,9
DGJ	M	A-I-C	Estenosante (esôfago), perianal, baixa estatura, pneumonia de repetição, corticodependente, precoce Granuloma oral e em cólon	Não	IL10RB – rs8178561 NOD2 – rs1861759	Proteção para DII DC	2,4	11,2	22016,0	3,6
EAS	M	Mtx-I	Inflamatório, baixa estatura, corticorresistente, precoce Granuloma em cólon	Não	IL10- rs3024493 NOD2 – rs1861759	Associação com DII, RU DC	-	-	-	-
CIG	F	A	Fistulizante, corticodependente, precoce	Sim	NOD2 – rs2066845 rs2066842 rs2066843 rs2076756	Susceptibilidade para DII, DC DC Susceptibilidade para DII, DC Susceptibilidade para DII, DC com possibilidade cirúrgica, inflamação de intestino grosso	3	21,5	14003,6	2,5
LSO	F	A	Fistulizante, precoce	Sim		Proteção para DII	-	-	-	-

					IL10RA – rs4252249 rs425270 NOD2 – rs2066844 rs2066845 rs5743289 rs2076756	Proteção para DII Susceptibilidade para DII, DC Susceptibilidade para DII, DC Susceptibilidade para DII, DC com possibilidade cirúrgica, inflamação de intestino grosso Susceptibilidade para DII, DC com possibilidade cirúrgica, inflamação de intestino grosso				
SGS	F	A	Fistulizante, perianal, precoce	Sim	NOD2 – rs1861759	DC				
DPC	F	A-I	Fistulizante, perianal, precoce	Não	IL10 – rs3024493	Associação com DII, RU	5,5	62,3	28827,8	7,8
PGE	M	A	Inflamatória, tardia	Não	IL10 – rs3024493	Associação com DII, RU	31,4	55	11859,1	40,4
YM	F	A-C	Inflamatória, corticorresistente, tardia	Não	IL10 – rs3024493	Associação com DII, RU	-	-	-	-
ACS	M	A	Inflamatória, tardia	Não	IL10 – rs3024493 IL10RA - rs10892202 rs4252249	Associação com DII, RU Proteção para DII Proteção para DII	1,3	29,6	14269,2	5,8
ALM	M	A-C	Inflamatória, corticorresistente, tardia	Não	IL10RA – rs10892202 rs4252249 rs4552270 NOD2 – rs2066842 rs5743291	Proteção para DII Proteção para DII Proteção para DII DC DC	4,2	25,5	22288,8	2,5
LAS	F	A-I	Fistulizante, baixa estatura, corticorresistente, tardia	Não	IL10RA – rs2228054 rs2228055 NOD2 – rs2066842	Risco aumentado para DC precoce e DII muito precoce Risco aumentado para DC precoce e DII muito precoce DC	-	-	-	-
LCB	F	A	Inflamatória, tardia Granuloma em cólon	Não	IL10RA – rs4252249 rs4552270 IL10RB – rs1058867	Proteção para DII Proteção para DII Associação com risco aumentado de DC	2,3	18,9	6337,1	3,6

					NOD2 - rs2066842	DC				
GPS	M	A-I	Estenosante, tardia	Não	NOD2 – rs1861759	DC				

Quadro 8 – Pacientes com RU avaliados quanto à presença de polimorfismos genéticos da IL10 e seus receptores e o NOD2, os fenótipos apresentados, os fenótipos esperados e a expressão de IL10 e de seus receptores e do NOD2.

Paciente	Sexo	Tratamento	Fenótipo apresentado	Cirurgia	Polimorfismo	Fenótipo esperado	IL10	IL10RA	IL10RB	NOD2
FGS	F	Ms	Inflamatória, tardia	Não	IL10RB – rs8178561 NOD2 – rs1861759 rs5743291	Proteção para DII DC DC	-	-	-	-
CG	F	A	Inflamatória, colangite esclerosante, precoce	Não	IL10 – rs3024493 IL10RB – rs1058867 NOD2 – rs2066842	Associação com DII, RU Associação com risco aumentado de DC DC	3,5	15	11582,9	4,8
GG	M	Ms	Inflamatória, tardia	Não	IL10RA – rs2228054 rs2228055	Risco aumentado para DC precoce e DII muito precoce Risco aumentado para DC precoce e DII muito precoce	2,4	13,8	21969	2,1
SEG	F	A-C	Inflamatória, colangite esclerosante, tardia	Não	IL10RA – rs10892202 rs4252249 rs4252270 NOD2 – rs2066844 rs5743289 rs2076756	Proteção para DII Proteção para DII Proteção para DII Susceptibilidade para DII, DC Susceptibilidade para DII, DC com possibilidade cirúrgica, inflamação de intestino grosso Susceptibilidade para DII, DC com possibilidade cirúrgica, inflamação de intestino grosso	2	10,5	15405,4	1
JPJ	M	A-C	Inflamatória, baixa estatura, tardia	Não	IL10RA – rs2228054 rs2228055	Risco aumentado para DC precoce e DII muito precoce Risco aumentado para DC precoce e DII muito precoce	1,4	10,4	20707,9	2,9
EFA	M	Ms	Inflamatória, tardia	Não	IL10RA – rs10892202 rs4252249 NOD2 – rs2066842 rs2066843 rs1861759 rs2066844 rs5743289 rs2076756	Proteção para DII Proteção para DII DC Susceptibilidade para DII, DC DC Susceptibilidade para DII, DC Susceptibilidade para DII, DC com possibilidade cirúrgica, inflamação de intestino grosso Susceptibilidade para DII, DC com possibilidade cirúrgica, inflamação de intestino grosso	2	20,9	14043,3	1,8
RFS	F	A	Inflamatória, tardia	Não	IL10RA – rs2228054	Risco aumentado para DC precoce e DII muito precoce	3,0	17,6	17620,6	4,0

					rs2228055	Risco aumentado para DC precoce e DII muito precoce				
RFA	M	A	Inflamatória, colangite esclerosante, tardia	Não	IL10 – rs3024493 IL10RA – rs2228054 rs2228055	Associação com DII, RU Risco aumentado para DC precoce e DII muito precoce Risco aumentado para DC precoce e DII muito precoce	-	-	-	-
EGG	M	A	Inflamatória, tardia	Não	IL10RA – rs4252249 rs4252270 IL10RB – rs1058867 NOD2 – rs5743291	Proteção para DII Proteção para DII Associação com risco aumentado de DII DC	-	-	-	-
EVC	F	A	Inflamatória, tardia	Não	IL10RB – rs1058867	Risco aumentado para DII	3,1	39,2	11564,0	3,6
FMS	F	Ms	Inflamatória, tardia	Não	IL10RB – rs8178561 NOD2 – rs2066842	Proteção para DII DC	2,9	19,4	29606,1	8,5
GRS	F	Ms	Inflamatória, tardia	Não	IL10 – rs3024493 IL10RA – rs4252249 rs4252270 IL10RB – Rs1058867	Associação com DII, RU Proteção para DII Proteção para DII Risco aumentado para DII	3,7	28,2	33424,2	2,3
JCG	M	Ms	Inflamatória tardia	Não	IL10RB – rs1058867 NOD2- rs2066842 rs2066843	Risco aumentado para DII DC Susceptibilidade para DII, DC	-	-	-	-
JTS	F	A	Inflamatória tardia	Não	NOD2 – rs5743291	DC	0,4	44,6	44047,9	2,1
MLC	F	Ms	Inflamatória tardia	Não	IL10RA – rs2228054 rs2228055 IL10RB – rs1058867 NOD2 – rs2066842 rs5743291	Risco aumentado para DC precoce e DII muito precoce Risco aumentado para DC precoce e DII muito precoce Risco aumentado para DII DC DC	-	-	-	-
MVD	F	M	Inflamatória tardia	Não	NOD2 – rs1861759	DC				
MNS	F	Ms	Inflamatória tardia	Não	IL10RA – rs2228054	Risco aumentado para DC precoce e DII muito precoce	-	-	-	-

					rs2228055 NOD2 – rs2066842	Risco aumentado para DC precoce e DII muito precoce DC				
--	--	--	--	--	----------------------------------	---	--	--	--	--

5 DISCUSSÃO

5.1 Características gerais da casuística

Os pacientes estudados foram recrutados de um único centro de referência para o atendimento de DII em crianças e adolescentes. Nesse centro de referência, o atendimento periódico desses pacientes em ambulatório especializado com padronização de condutas permitiu o registro de informações e a realização do estudo. Os resultados mostraram um grupo de crianças e adolescentes heterogêneo a partir da análise de suas características clínicas, laboratoriais, endoscópicas, histológicas e moleculares.

Nos 66 pacientes avaliados, os casos de RU foram vistos com mais frequência. Essa predominância de pacientes com RU é compatível com o descrito por outros autores (CASTRO et al., 2008; MOLODECKY et al., 2012; TURUNEM et al., 2006). Os nossos dados são semelhantes aos dados de outra casuística brasileira, relatada por LIMA et al. (2013), cujos pacientes também foram provenientes de um único centro de referência localizado no Nordeste do Brasil. Esses autores descreveram 30 pacientes com DII, sendo que 60% tinham RU (LIMA et al., 2013), assim como foi observado em nosso estudo. Nem todos os artigos são concordantes quanto à predominância da RU na faixa etária pediátrica. Em 2016, Zhou e Huang descreveram 41 casos de DC em um grupo de 49 crianças. Os próprios autores justificaram esses achados devido às diferenças regionais e ao tamanho da amostra, reafirmando a importância do levantamento de casos de DII nas diferentes regiões do mundo (ZHOU; HUANG, 2016).

No nosso estudo, o predomínio de pacientes oriundos do interior do estado de Pernambuco (59%) reflete o perfil do nosso serviço. O hospital do estudo, o IMIP, assim como o seu serviço de gastroenterologia pediátrica são referências para pacientes encaminhados com quadros mais graves, bem como pacientes com doenças de curso crônico das diferentes regiões do estado. Todavia, esse dado difere do que classicamente é sabido sobre as características geográficas da DII. Sabe-se que a DII é predominante em populações de centros urbanos e mais frequente em países desenvolvidos (MOLODECKY et al., 2012; WONG; NG, 2013), diminuindo a sua frequência em países em desenvolvimento, em zonas rurais e comportando-se com o chamado gradiente norte-sul entre os hemisférios e até entre os continentes. Mas, a partir da análise de uma única casuística, não é possível se especular o comportamento da doença em termos de sua distribuição geográfica e extrapolar essas informações. Em vez disso,

pode-se utilizar esse dado para reconhecer a presença da DII em todo o estado, mesmo em áreas rurais, fugindo do protótipo da associação da DII com regiões mais desenvolvidas. Esse reconhecimento gera mais atenção para o diagnóstico e conduta adequada.

Outra diferença ilustra o viés de seleção desse grupo, a frequência de pacientes com apresentações clínicas graves: início da doença antes dos 2 anos de idade (DII infantil) e a proporção de casos complicados com fístulas, estenoses e doença perianal, chegando a 50% dos casos de DC Infantil e Tardia. Novamente, a condição de serviço de referência favorece a triagem de doença mais complicada e mais precoce na busca por atendimento especializado. Em particular, os pacientes com DII do subgrupo Infantil são graves na maioria das vezes e necessitam de diagnóstico precoce, muitas vezes apresentando doença complicada, sendo necessário o diagnóstico diferencial com síndromes genéticas de caráter monogênico que muitas vezes simulam imunodeficiências e comportam-se com o fenótipo DII-símile (BIANCO; GIRARDELLI; TOMMASINI, 2015).

A DII ainda é uma doença pouco conhecida na faixa etária pediátrica e, com frequência, é confundida com quadros de enteroinfecções, o que contribui para retardar o seu diagnóstico (LOUIS, 2015). Em uma revisão sobre o diagnóstico e o diagnóstico diferencial da DII em crianças feita em 2016, Palle; Prasad e Kugathasan ressaltam a importância do diagnóstico diferencial da DII em crianças com as colites infecciosas por *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, Citomegalovírus, *Clostridium difficile*, entre outros. O que é justificável dada a grande frequência das colites infecciosas principalmente nas populações menos favorecidas e pelo quadro clínico muito parecido com a fase inicial de muitos casos de DII, o que seria compatível com a nossa região (LINS; MOTTA; SILVA, 2003). A revisão de Palle, Prasad e Kugathasan, em 2016, também resalta a importância de aventar o diagnóstico de DII na faixa etária pediátrica, mesmo sendo menos frequente. O curso agressivo, complicações e sequelas que são inerentes à DII em crianças exigem diagnóstico precoce para que se iniciem rapidamente intervenções que possam minimizar as repercussões da doença sobre o processo de crescimento e desenvolvimento (PALLE; PRASAD; KUGATHASAN, 2016). O diagnóstico diferencial com imunodeficiências primárias (UHLIG et al., 2014), enterocolites associadas à doença de Hirschsprung, colites alérgicas, vasculites e colites microscópicas também precisa ser realizado

e frequentemente exige o parecer de outros especialistas (LEVINE et al., 2013; PALLE; PRASAD; KUGATHASAN, 2016).

Esses pacientes enfrentam a dificuldade do diagnóstico antes de chegar ao serviço especializado. No nosso estudo, encontramos diferença de até 54 meses na mediana da idade do início dos sintomas e a idade do diagnóstico nos pacientes com DC Precoce. Os pacientes com quadros de DC Infantil, nos quais houve 71,4% de casos com doença complicada, tiveram redução entre a idade de início dos sintomas e o diagnóstico. Esses pacientes também tiveram início dos sintomas muito cedo, sendo a mediana para DC Infantil de 5,82 meses e de RU infantil de 9,5 meses, ou seja, no primeiro ano de vida. A DII Infantil, por ser grave e de início muito precoce, muitas vezes em pacientes com menos de um ano de vida, tem seu diagnóstico mais precoce (TURNER; MUISE, 2017). A maior frequência desses pacientes no nosso estudo provavelmente se deve ao encaminhamento precoce ante a gravidade e urgência do quadro clínico, fazendo com que esses pacientes cheguem mais rapidamente ao centro de referência.

Ressaltamos ainda a frequência alta de pacientes classificados no subgrupo infantil. A DC Infantil correspondeu a 56% (14/25) dos casos de DC do estudo, sendo que a RU Infantil correspondeu a 19,5% (8/41) do total de casos de RU. Begue et al. (2011), ao estudar crianças com DII com início antes dos 5 anos de idade, relata 47% de casos de DC e 36% de casos de RU (BEGUE et al., 2011). Em contradição ao encontrado no nosso estudo, autores como Benchimol et al.(2014) encontraram uma frequência maior de RU em crianças menores de 5 anos ao analisar os casos de DII em crianças no período de 1994-2009 em Ontário, no Canadá. Nesse estudo, os autores compararam as características epidemiológicas da DII de início em menores de 6 anos com as de os pacientes com DII de início tardio (BENCHIMOL et al., 2014). Bequet et al. (2016), em um estudo comparativo entre a DII de início muito precoce (menores de 6 anos) e de início tardio de 1.412 crianças francesas, também encontraram maior frequência de RU, apesar da maior frequência da DC em todas as crianças avaliadas ao somar os grupos de início muito precoce e tardio (BEQUET et al., 2016). Ao avaliar essas diferenças, alguns dados do nosso estudo devem ser enfatizados, como a idade desse subgrupo infantil e gravidade apresentada já no início da doença. Contudo, nenhum desses estudos consideraram a idade limite de 2 anos, como foi feito na nossa análise, descrevendo melhor esse subgrupo de crianças previsto na Classificação de Paris (LEVINE et al., 2011) com características tão peculiares.

Nos últimos anos, tem sido dada mais atenção ao grupo infantil, e o que se observa é o número cada vez maior de autores preocupados em analisar esses casos (BEGUE et al., 2011; BEQUET et al., 2016; GLOCKER et al., 2009; KAMMERMEYER et al., 2016; KELSEN et al., 2015; MORAN et al., 2013; MUISE; SNAPPER; KUGATHASAN, 2012; PIGNEUR et al., 2013; RUEMMELE et al., 2006). Os pacientes com DII com início antes dos 6 anos de idade, em particular antes de 2 anos de idade, apresentam com maior frequência associação com imunodeficiências (UHLIG et al. 2014). Em alguns casos, acredita-se que a herança seja monogênica e a doença se apresente com fenótipo semelhante à DII (DII-símile), porém mais agressiva e muitas vezes caracterizada por pancolite com formação de fístulas, doença perianal e pouca resposta ao tratamento convencional para DII (TURNER; MUISE, 2017; UHLIG et al., 2014).

O fenótipo agressivo e pouco responsivo dos pacientes com DII Infantil foi descrito por Ruemmele et al. (2006): um grupo de crianças com DII de evolução atípica (RUEMMELE et al., 2006). A partir desse relato, surgiu uma série de estudos e um marco na literatura foi quando Glocker et al. (2009) publicaram os primeiros trabalhos associando esse grupo de início precoce da DII, porém mais agressivo, ao quadro de imunodeficiência (GLOCKER et al., 2009). Nesse artigo, os autores associam a DII que posteriormente foi chamada de Infantil pela Classificação de Paris (LEVINE et al., 2011) a um defeito na via de sinalização da IL10 e, posteriormente, autores de outros países também descreveram essa associação (BEGUE et al., 2011; ENGELHARDT et al., 2013; GLOCKER et al., 2009; MORAN et al., 2013; PIGNEUR et al., 2013). Logo, essas crianças com curso mais agressivo de doença foram mais investigadas, sendo observado que muitas tinham associações não só com alterações na via de sinalização da IL10, como apresentavam outros defeitos genéticos. Especula-se que esses defeitos possam estar associados aos quadros clínicos mais agressivos da DII (BIANCO; GIRARDELLI; TOMMASINI, 2015; UHLIG et al., 2014).

Quanto ao sexo, no nosso estudo foi encontrada uma predominância do sexo masculino tanto nos pacientes com DC quanto nos pacientes com RU. Essa distribuição difere entre os estudos realizados com crianças e adultos como é relatado na revisão de Sauer e Kugathasan (2009) que faz o contraponto entre esses estudos (SAUER; KUGATHASAN, 2009). Malaty et al. (2010) verificaram em sua coorte retrospectiva em um hospital do Texas (USA) que a DC foi mais frequente nos meninos e a RU nas meninas. (MALATY et al., 2010). Herzog et al.

(2014) encontraram em crianças suíças menores de 10 anos o predomínio de meninos na DC e predomínio de meninas na RU (HERZOG et al., 2014). Hildebrand et al. (2003), ao estudar crianças suecas no período de 12 anos, verificaram uma incidência aumentada de meninos com DC comparada a uma taxa de incidência semelhante entre os sexos nas crianças com RU (HILDEBRAND et al., 2003). Tais estudos apresentam dados diferentes e não mostram um padrão de distribuição da DII entre os sexos na população pediátrica.

A DII complicada esteve presente em todas as faixas etárias e ambos sexos no nosso estudo. Contudo, o comprometimento perianal esteve presente em uma proporção importante dos pacientes com DC subgrupo Infantil e Tardio, com 78,6% e 75% dos casos, respectivamente. Nesses dois grupos, a mediana de tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico foi mais curta em relação ao subgrupo Precoces. A doença perianal é definida como inflamação perto ou no ânus, caracterizando-se pela presença de *tags*, fissuras, fístulas, abscessos ou estenoses com sintomas de dor, prurido, sangramento, drenagem purulenta e incontinência fecal (DE ZOETEN et al., 2013). Adler et al. (2016), ao avaliar 7.076 crianças com DC, encontraram 1.399 casos (21%) de doença perianal em crianças dos Estados Unidos (ADLER et al., 2016). Assa et al. (2017) encontraram 24% de casos de doença perianal em 234 crianças com DII em um estudo multicêntrico envolvendo crianças dos Estados Unidos, Israel e da Europa (ASSA et al., 2017). Esses estudos relatados avaliam crianças com DII de idades diferentes, desde o início da doença em menos de 2 anos até adolescentes. Begue et al. (2011) descreve um subgrupo de 13 crianças com DII de início antes de 1 ano de idade e encontra doença perianal em 54% dos casos, enfatizando a importância dessa manifestação clínica nessa idade. A doença perianal mostra-se um dado importante na avaliação da possibilidade da DII em crianças do subgrupo Infantil, idade na qual a quantidade de diagnósticos diferenciais é grande o que dificulta o diagnóstico de DII. As imunodeficiências primárias, como a doença granulomatosa crônica, a deficiência de IL10, glicogenose do tipo 1b, deficiência de adesão de leucócitos do tipo, XIAP (síndrome linfoproliferativa ligada ao X do tipo 2) e as doenças infecciosas fazem parte desse diagnóstico diferencial no qual a doença perianal é um sintoma importante (GLOCKER; GRIMBACHER, 2012; UHLIG, 2013).

A diarreia foi o sintoma mais frequente nos dois grupos de DC e RU (Precoces e Tardio), o que era esperado já que a diarreia constitui um sintoma clássico de ambas as formas da DII (DE BIE et al., 2013; LEVINE et al., 2013). Porém nos subgrupos de DII Tardia, tanto

de DC quanto de RU, a dor abdominal e o comprometimento pondero-estatural superaram a diarreia como sintomas mais frequentes. A dor abdominal e o comprometimento pondero-estatural são sintomas relevantes e frequentes em ambas as formas da DII (LEVINE et al., 2013). Dada essa relevância, a primeira é usada nos dois escores de avaliação de atividade inflamatória utilizados na pediatria (PUCAI e PCDAI) como sintoma indicativo de presença de atividade inflamatória (HYAMS et al., 1991; TURNER et al., 2007). O comprometimento pondero-estatural por sua vez não está presente no PUCAI devido à sua falta de significância durante a construção deste escore. Contudo, o comprometimento pondero-estatural é pontuado no PCDAI, assim como está presente na Classificação de Paris para crianças com DC (HYAMS et al., 1991; LEVINE et al., 2011).

5.2 Estado nutricional

A DII acomete o trato gastrointestinal da boca ao ânus de forma salteada na DC e acomete o cólon de forma contínua na RU. Assim os pacientes com DII podem ter diversas apresentações fenotípicas (DE BIE et al., 2013). Os vários fenótipos da DII também repercutem no status nutricional, já que nem sempre o paciente vai ter má absorção, comprometimento nutricional pela inflamação ou anorexia. Por outro lado, não pode se deixar de fora da análise a influência do uso das medicações do tratamento da DII, por exemplo, no estado nutricional desses pacientes.

A avaliação estatural é importante no momento do diagnóstico, na avaliação de atividade inflamatória e na resposta ao tratamento. A classificação estatural no momento do diagnóstico é parte da Classificação de Paris para a DC (LEVINE et al., 2011). Segundo essa classificação, o crescimento linear seria considerado para classificar o paciente com ou sem déficit de crescimento (*Growth*), ou seja, G0 ou G1. O PCDAI também avalia alterações estaturais como parte dos seus escores para pontuar e, por fim, definir se há ou não atividade inflamatória (HYAMS et al., 1991). Uma vez o paciente diagnosticado e tratado, a adequação estatural, como em todo paciente pediátrico crônico, é um objetivo a ser alcançado sob pena de ser considerada falha no tratamento, caso não ocorra um adequado ganho ponderal e crescimento do paciente (RUEMMELE et al., 2014; TURNER et al., 2012).

A complexidade do paciente com DII se estende ao *status* nutricional. A variação de fenótipos e de locais de lesão vai repercutir no quadro nutricional que pode ser evidenciado na avaliação antropométrica rotineira até a avaliação mais específica, levando em conta outras avaliações como de micronutrientes, da saúde óssea e metabólica. São exemplos de patologias que podem acometer o paciente com DII, a anemia ferropriva, a osteoporose, a diabetes (BÄHLER et al., 2017; GUZ-MARK et al., 2017). O nosso estudo deteve-se na avaliação antropométrica de rotina da consulta médica pediátrica, limitando-se à coleta de peso, estatura e IMC. Toda a avaliação seguinte foi baseada no IMC dada a acessibilidade a esse dado feito de rotina nas consultas, sendo identificados diagnósticos relacionados ao *status* nutricional dos pacientes avaliados, porém não sendo possível expandir para uma avaliação nutricional mais completa e detalhada por não ser objetivo do estudo.

Uma proporção dos pacientes no momento do estudo, tanto com DC quanto com RU, apresentava elevação do IMC compatível com sobrepeso e obesidade, sendo a maioria pacientes com DC. Esse achado remete à importância da avaliação nutricional dos pacientes com DII e a existência também de pacientes com sobrepeso e obesidade em detrimento da desnutrição bem relatada em pacientes com DII (HYAMS et al., 1991; LEVINE et al., 2011). A presença da obesidade na DII pediátrica também é relevante e já é citada em estudos como de Long et al.(2011) que encontrou a prevalência de sobrepeso e obesidade em 23,6% de 1.598 crianças com DII (LONG et al., 2011).

A obesidade na DII tem caráter multifatorial, está associada com o uso de corticoesteroides, em particular na RU, considerando que a DC tem associação aos casos mais graves e, portanto, com maior associação com desnutrição (WIECH; BINKOWSKA-BURY; KORCZOWSKI, 2017). No nosso estudo, os pacientes com DC Tardia estavam em uso de corticoesteroides por mais de quatro semanas e apresentavam sobrepeso. Pituch-Zdanowska et al. (2016) avaliaram através de um estudo retrospectivo a presença de sobrepeso e obesidade no momento do diagnóstico de pacientes com DII (PITUCH-ZDANOWSKA et al., 2016). Esse estudo encontrou que a prevalência de sobrepeso e obesidade foi maior nos pacientes com RU assim como o risco de obesidade era 3,5 vezes maior para os pacientes com RU, chamando atenção que nem sempre o comprometimento nutricional na DII é devido à desnutrição (PITUCH-ZDANOWSKA et al., 2016). Outros fatores, como diminuição da atividade física e ingestão calórica em excesso, também contribuem para o excesso de ganho de peso dos

pacientes com DII como verificado pelos mesmos autores (PITUCH-ZDANOWSKA et al., 2016), porém não é possível relatar tais associações neste estudo.

Na nossa pesquisa, a eutrofia predominou no momento do diagnóstico, chegando a 66,6% dos casos nos pacientes do subgrupo de RU infantil. Esse subgrupo tem uma diferença de medianas entre o início dos sintomas e o diagnóstico de 35 meses, porém tal fato não parece ter interferido no *status* nutricional dos pacientes. Provavelmente o acometimento colônico, limitado à superfície mucosa de uma região não responsável por absorção de nutrientes e não penetrante da RU, permitiu que esses pacientes permanecessem na condição de eutrofia até o momento do diagnóstico.

O comportamento diferente teve 32% dos pacientes com DC (35,7% DC Infantil e 30% DC Tardia) que apresentavam baixo peso e muito baixo peso no momento do diagnóstico. No estudo de LONG et al. (2011), o uso de tiopurinas como a azatioprina apresentou uma associação inversamente proporcional à obesidade e foi justificado pelo uso maior dessas medicações em pacientes mais graves e com distúrbios de má absorção (LONG et al., 2011). Kim (2016) levanta os principais fatores relacionados à desnutrição na DII pediátrica: a gravidade da doença, genótipo, aumentos de citocinas inflamatórias com o $TNF\alpha$, IL6 e IL1 β (KIM, 2016). Ainda segundo essa revisão, a DII deixa o paciente sem apetite devido aos sintomas gastrointestinais e há perdas como consequência da inflamação da mucosa e, mesmo na presença da ingestão adequada de nutrientes, haverá um desequilíbrio entre a ingestão e a efetiva digestão/absorção de nutrientes (KIM, 2016).

Dada a importância da avaliação do ganho ponderal e do crescimento linear do paciente com DII, julgou-se importante analisar a evolução do percentil de IMC do paciente desde o diagnóstico até o momento do estudo. No entanto, não se conseguiu visualizar um padrão. É como se cada paciente tivesse uma trajetória própria, alguns em condições estáveis do momento do diagnóstico ao momento do estudo, outros com redução ou aumento do IMC. Ressalta-se o número de pacientes com aumento do IMC chegando à condição de sobrepeso e obesidade durante o tratamento, principalmente no subgrupo de RU Tardia. Muitos desses pacientes haviam utilizado ou estavam utilizando corticoesteroides por mais de quatro semanas, o que sugere a associação do sobrepeso e obesidade a essas medicações. No entanto, apesar de a realização de inquérito alimentar não fazer parte deste estudo, foram identificados, durante a avaliação desses pacientes, erros alimentares que contribuíram para o sobrepeso.

No subgrupo de RU Tardia (grupo maior e heterogêneo), alguns pacientes passaram do *status* de eutrofia para o *status* de desnutrição, tendo pacientes que já eram desnutridos que apresentaram piora do quadro nutricional. Em todos os casos, havia presença de atividade inflamatória. É sabido que as citocinas pró-inflamatórias contribuem para o déficit nutricional (KIM, 2016). Shamir (2009) ressalta que a anorexia está ligada a níveis mais aumentados de IL1 e TNF (SHAMIR, 2009). Além disso, essas citocinas estão associadas com retardo do crescimento linear, inclusive pacientes com DC podem ter redução da velocidade de crescimento muito antes do diagnóstico de DC, devendo a DII ser investigada em casos onde a causa da redução da velocidade de crescimento não é identificada (KIM, 2016).

Os exemplos de pacientes apresentados na seção dos resultados ilustraram três questões nutricionais que podem aparecer na DII. O paciente EAS tinha o diagnóstico nutricional de muito baixo peso no momento do diagnóstico de DC, sendo iniciado azatioprina. A corticodependência apresentada por esse paciente se constitui uma condição de risco para obesidade e doenças ósseas como a osteoporose, daí ser indicada a substituição do corticoide por imunobiológico (RUEMMELE et al., 2014). Nesse caso, a necessidade do tratamento para a atividade inflamatória levou a consequências indesejadas como a corticodependência, o que deve ser alvo de vigilância do médico acompanhante para a pronta correção e modificação do tratamento instituído.

O segundo exemplo relatado, o paciente GHS, apresentava uma forma complicada da DC não responsiva a corticoides e desnutrição. Esse paciente evoluía com queda de IMC e baixa estatura associadas com a falta de controle da atividade da doença. A elevação de citocinas pró-inflamatórias, o aumento do catabolismo, a presença da fístula perianal, PCDAI aumentado e a PCR aumentada foram fatores que provavelmente contribuíram para a evolução nutricional desfavorável do paciente (KIM, 2016).

O paciente MSR exemplifica a complexidade da avaliação nutricional no paciente com DII. O adolescente, com RU na forma tardia, surgimento após os 10 anos de idade, não apresentava atividade inflamatória. Toda a sua avaliação de atividade inflamatória foi negativa. O paciente tinha um erro alimentar importante que necessitou de acompanhamento nutricional mais rigoroso. Uma rotina alimentar correta tem importante papel na DII pediátrica (GUAGNOZZI et al., 2012). O crescimento linear e o *status* nutricional são afetados pelas medicações utilizadas e pelo processo inflamatório (PENAGINI et al., 2016; WONG; NG,

2013). Portanto, erros e transtornos alimentares típicos da infância e adolescência devem ser questionados e investigados no paciente com DII que não evolui bem do ponto de vista nutricional, principalmente se não há atividade inflamatória naquele momento.

Os casos descritos e a variabilidade de *status* nutricional do paciente com DII ressalta a necessidade de uma avaliação mais detalhada do paciente com DII do ponto de vista nutricional (FORBES et al., 2017; WIECH; BINKOWSKA-BURY; KORCZOWSKI, 2017). O conhecimento das possibilidades de distúrbios nutricionais no paciente com DII é importante e exige uma avaliação multidisciplinar periódica baseada nas recomendações da literatura e visando a correção de todos os distúrbios nutricionais do paciente com DII (FORBES et al., 2017).

5.3 Atividade inflamatória

Os pacientes foram avaliados à medida que foram recrutados para este estudo quanto à presença de atividade inflamatória segundo os índices de PCDAI e PUCAI, estando a maioria dos pacientes em remissão, chegando até 57,1% dos casos nos pacientes com DC Precoce e 83,3% dos casos nos pacientes com RU do subgrupo Tardio. O PCDAI foi desenvolvido para avaliar a atividade inflamatória dos pacientes com DC quanto à sua presença ou ausência, além da sua intensidade, e baseia-se em quatro parâmetros: história, exame físico, crescimento e exames laboratoriais. Esse índice consegue avaliar a atividade inflamatória dos pacientes com DC com acurácia e atualmente é utilizado em estudos como os ensaios clínicos (HYAMS et al., 2005; NUTI et al., 2016). O PUCAI é válido pela sua excelente correlação com o índice de Mayo, amplamente utilizado em adultos (D'HAENS et al., 2007), permitindo diferenciar com acurácia a doença ativa da doença em remissão. Tem as vantagens de não ser invasivo, não necessitar de colonoscopia e ser de fácil aplicação (TURNER et al., 2007).

Avaliamos também a atividade inflamatória nos níveis laboratorial, endoscópico e histológico, comparando com a avaliação clínica sugestiva de atividade inflamatória desses pacientes.

A presença de clínica correspondeu à presença de atividade laboratorial, de atividade endoscópica ou de atividade histológica em mais de 80% dos pacientes com DC. Contudo, ao avaliar essa correspondência nos pacientes com RU, verificou-se que houve significância

estatística em relação aos parâmetros de atividade endoscópica e histológica. No grupo de pacientes com RU, constatou-se a importância e relevância dos sintomas clínicos de atividade inflamatória. Isso fica mais evidente quando identificamos ao mesmo tempo a presença de atividade endoscópica, corroborando com o PUCAI, cuja avaliação é de caráter estritamente clínico sem avaliação laboratorial (TURNER et al., 2007).

Essas observações ressaltam a importância dos sinais e sintomas clínicos como marcadores de atividade inflamatória. Do ponto de vista global, a avaliação da atividade inflamatória pelo PUCAI já é validada nos pacientes pediátricos com RU. Esse escore foi construído através de um estudo multicêntrico, no entanto não foi validado no Brasil (FIGUEREDO et al., 2004; LIMA et al., 2013). Assim, apesar de não tratar de um estudo de validação desse índice e da pequena amostra avaliada, tal fato aponta para a valorização dos sintomas clínicos como marcador de atividade inflamatória nos pacientes com RU.

Foram verificadas poucas diferenças ao avaliar PCR e/ou VHS, os achados endoscópicos e histológicos, em relação à clínica do paciente. Uma delas foi a queda na frequência de PCR e/ou VHS positivas em relação à clínica presente, porém sem perder a significância estatística. Nos pacientes com RU com clínica negativa, verificou-se um aumento gradual na frequência da atividade laboratorial (VHS e/ou PCR), endoscópica e histológica, sendo de 14,3%; 35,7%; 57,1%, respectivamente. Esse fato leva à reflexão de que, nos pacientes assintomáticos, a presença de alterações de PCR e/ou VHS podem indicar presença de atividade inflamatória em mucosa mesmo que não sintomática, ressaltando a vigilância necessária dos pacientes assintomáticos e que só demonstram alterações laboratoriais. Tal fato não foi verificado na Tabela 4, na qual os pacientes com RU com clínica negativa não tinham duas ou mais alterações laboratoriais.

Apesar de esta observação poder colocar os dois últimos parágrafos em contradição, deve-se ressaltar que o PUCAI constitui um escore que gera uma pontuação de 0-85 a fim de diagnosticar a presença de atividade inflamatória (TURNER et al., 2007). A chamada atividade clínica deste estudo levou em consideração a presença de um ou mais sintomas clínicos associados à DII pediátrica, não configurando um índice ou escore. Portanto, a simples avaliação de presença ou não de sintomas não considerando o PUCAI não permitiu excluir atividade inflamatória laboratorial de todos os pacientes com RU deste estudo.

A avaliação em particular de PCR ou de VHS em contraste com a presença ou ausência de sintomas clínicos mostrou a elevada correspondência do aumento de um desses dois biomarcadores e a presença de clínica (83,3%) nos pacientes com DC. Tal fato não foi verificado na RU. Nos pacientes de RU, os pacientes com clínica ausente apresentaram mais de 90% (93,3%) de frequência na correspondência com PCR ou VHS normais, sendo a correspondência desta última estatisticamente significativa. Turner et al. (2011), ao estudar 75 crianças com RU, verificaram que, em cerca de 70% das crianças, tanto a PCR quanto a VHS refletiam atividade inflamatória em mesmo grau, sendo uma ou outra suficiente para essa avaliação, com leve superioridade da PCR devido à sua melhor correlação com as alterações endoscópicas (TURNER et al., 2011).

A presença de pacientes sintomáticos com exames laboratoriais e histológicos normais pode ser explicada pela existência de sintomas compatíveis com a síndrome de intestino irritável já bem relatada em pacientes com DII (BERRIL et al., 2013; DIEDEREN et al., 2016). Esses autores defendem que os pacientes podem persistir sintomáticos sem estarem em atividade inflamatória já que as provas de atividade inflamatória séricas e a avaliação da calprotectina estavam normais (JELSNESS-JØRGENSEN; BERNKLEV; MOUM, 2013; WAUGH et al., 2016).

Os pacientes do estudo tiveram uma avaliação da atividade inflamatória também no nível molecular por meio da pesquisa de citocinas inflamatórias no tecido colônico. Tanto nos pacientes com DC quanto nos pacientes com RU, houve dificuldades na interpretação dos achados devido ao nosso estudo não contemplar um grupo controle saudável, por conta das limitações éticas.

Nos pacientes com DC que apresentavam atividade inflamatória em todos os níveis avaliados, DPC e WVS, observou-se uma relação do $TNF\alpha/IL10$ mais elevada. Porém, não foi verificado um padrão de elevação unicamente de citocinas consideradas inflamatórias podendo ser relacionado com a atividade inflamatória. O paciente JGR com atividade clínica, endoscópica e histológica, apresentou níveis altos de citocinas inflamatórias assim como a relação de $IL6/IL10$. O paciente PGE, recém-diagnosticado, sem tratamento ainda, apresentava atividade em todos os níveis avaliados, assim como havia o aumento importante das citocinas tanto anti-inflamatórias como pró-inflamatórias. No entanto, deve-se ressaltar que os pacientes avaliados estavam em estágios diferentes de tratamento, alguns recebendo inclusive

corticoesteroides, o que dificulta o encontro de informações que expliquem o comportamento das citocinas avaliadas nestes pacientes.

Um percentual menor de pacientes, que chegava a 33,3% nos pacientes com RU, apresentava clínica sugestiva de atividade inflamatória, no entanto, não tinham atividade laboratorial, endoscópica e/ou histológica presente. Esses sintomas podem ser explicados como a presença concomitante da síndrome do intestino irritável em alguns pacientes, como sugerem alguns autores, confundindo com sintomas de atividade inflamatória da DII (ABDALLA et al., 2017). Estudos sugerem que a avaliação laboratorial normal pode ajudar a esclarecer e a diferenciar a presença ou não de atividade inflamatória nesse grupo de pacientes, em particular os marcadores fecais (BERRIL et al., 2013; KAISER et al., 2007; JELSNESS-JØRGENSEN; BERNKLEV; MOUM, 2013; PFEFFERKORN et al., 2010).

Outro ponto em questão nos pacientes sem atividade laboratorial, endoscópica ou histológica está relacionado com o conceito de remissão da atividade inflamatória. A remissão profunda da atividade inflamatória na DII consiste na ausência de sintomas clínicos, alterações laboratoriais e cicatrização da mucosa (ZALLOT; PEYRIN-BIROULET, 2013). Foram encontrados 16,6% (2/12) dos pacientes com DC e 33,3% (8/24) dos pacientes com RU nessa condição, sendo pacientes considerados em remissão de atividade inflamatória (Quadros 5 e 6). O conceito de remissão profunda é bem aplicado para a DC, todavia, é ainda discutido para a RU (DE CHAMBRUN; BLANC; PEYRIN-BIROULET, 2016; ROSENBERG et al., 2013; ZALLOT; PEYRIN-BIROULET, 2013). Na pediatria, tanto nos pacientes com DC quanto nos pacientes com RU, o conceito de remissão profunda ainda não é validado e rotineiramente aplicado, embora autores como Aloï et al. (2014) já tenham utilizado esses conceitos como objetivos do tratamento da criança com DII (ALOÏ et al., 2014).

Os pacientes com RU também não mostraram padrão em relação às citocinas, chamando atenção o paciente JSA, que apresentava níveis de TNF α elevado. No momento do estudo, JSA encontrava-se com pioderma gangrenoso em atividade apesar do uso de mesalazina. Esse paciente apresentava alterações em todos os níveis de atividade assim como na expressão de citocinas inflamatórias. A paciente FMS também apresentava atividade inflamatória que foi evidenciada não apenas no nível laboratorial assim como nos níveis de IL6 elevados. A relação da IL6 com a atividade inflamatória é citada na literatura (WANG et al., 2009). Por sua vez, o paciente DCO não apresentava nenhuma alteração que sugerisse presença

de atividade inflamatória, porém tinha níveis de TNF α elevados tanto quanto os níveis encontrados em pacientes em atividade inflamatória (SLEBIODA; ZBIGNIEW, 2014). Todos esses pacientes citados com RU estavam em tratamento havia mais de três meses. Portanto, não foi possível fazer uma análise clara entre a expressão tecidual de citocinas anti e pró-inflamatórias e a presença de atividade inflamatória (GYRES; TÓTH; ZÁDORI, 2014).

A busca por um marcador molecular de atividade inflamatória vem sendo relatada por alguns autores. Stronati et al.(2010) analisaram a expressão tecidual de citocinas inflamatórias em crianças com RU. Esses autores verificaram que há um aumento da expressão tecidual de citocinas de genes relacionados com a imunidade inata no cólon inflamado de crianças com colite ulcerativa relacionando com a patogênese da doença (STRONATI et al., 2010). Verdier et al. (2012) analisaram tecidos de crianças com DC e RU sem atividade inflamatória quantificando a expressão das IL23, IL12, IL17A, IL17F, IL6, e IL10 e verificaram a variação dessas citocinas ao longo do intestino, indicando variações de mecanismos reguladores específicos e das diferenças entre a DC e a RU (VERDIER et al., 2012). Velikova et al. (2017) estudaram a expressão das citocinas IL17A, IL23, IL6, TGF β 1 e IL10 em mucosas inflamadas e normais de 37 pacientes divididos em terapias com 5-ASA e com imunossupressores (azatioprina e corticoesteroides). Esses autores encontraram na mucosa inflamada níveis altos dessas citocinas, sendo o mais alto de IL6 e o menor de IL10. Os níveis de IL6 e TGF β 1 estavam mais aumentados na mucosa normal de pacientes com DII do que nos pacientes sem DII e menores na mucosa de pacientes tratados com imunossupressores em relação aos que recebiam 5-ASA (VELIKOVA et al., 2017). Portanto, há diversos fatores que podem influenciar o padrão de expressão de citocinas na mucosa, devendo-se considerar o tipo de DII, o *status* inflamatório do paciente e o tipo de medicação que ele está recebendo. Deve-se ponderar também a idade do paciente e se há polimorfismos genéticos específicos que possam modificar a expressão das citocinas na mucosa intestinal. Dados os vários contextos considerados, a análise molecular de tecido de cólon de pacientes com DII ainda é uma realidade distante e ainda não utilizada na prática clínica (LEVINE et al., 2013; RUEMMELE et a., 2014, TURNER et al., 2012).

5.4 Polimorfismos genéticos

A DII em crianças, assim como em adultos, é classicamente tida como uma doença de base genética com influência de diversos fatores ambientais na sua patogênese, embora ainda não claramente conhecida (VENEMA et al., 2017). Há mais de 200 loci de associação à DII que, especula-se, contribuem para o aparecimento tanto da DC quanto da RU. Há polimorfismos de genes associados ao sistema imunológico inato e ao sistema imunológico adaptativo (BIANCO; GIRARDELLI; TOMMASINI, 2015). De natureza predominantemente poligênica, a DII na infância vem sendo também associada à herança monogênica nos últimos 15 anos (GLOCKER et al., 2009; MORAN et al., 2016). Neste estudo, optamos por pesquisar os polimorfismos do NOD2 já associados com a DC e os polimorfismos da IL10 e seus receptores, ambos já descritos na infância. O NOD2 estaria associado à herança genética poligênica da DII e o IL10, à herança genética monogênica (RUEMMELE, 2010).

Os nossos pacientes, em sua maioria, apresentaram polimorfismos associados aos genes pesquisados, embora nem todos os polimorfismos da IL10 e seus receptores encontrados já terem sido associados à patogenicidade da DII. Alguns pacientes apresentaram mais de um polimorfismo, mas não se pode inferir sua participação na gênese da doença uma vez que não foi feita a avaliação funcional da expressão desses genes. Por sua vez, a expressão tecidual colônica dos genes estudados foi realizada, no entanto, não foi possível estabelecer uma relação desta com os polimorfismos apresentados devido às limitações já discutidas sobre a expressão de interleucinas e genes na mucosa intestinal (STRONATI et al., 2010; VELIKOVA et al., 2017; VERDIER et al., 2012).

Nos últimos anos, têm surgido muitos estudos genéticos, na maioria do tipo série de casos, de pacientes com DII-símile. Esse grupo parece ter forte associação com doença de origem monogênica, o curso clínico é agressivo e é difícil o controle com as terapias habituais (GLOCKER et al., 2009; MORAN et al., 2013; PIGNEUR et al., 2013). Ao analisarmos os pacientes com DC infantil, dos 13 que tiveram avaliação genética, 12 tinham polimorfismos, dez tinham DC complicada (fístula e/ou doença perianal). Um paciente, PE, com doença de início muito precoce e agressiva com fístula e estenose, não apresentou polimorfismos dentre os genes estudados o que não exclui a possibilidade de outras doenças monogênicas de comportamento DII-símile. Uhlig et al. (2014) discutem a possível herança monogênica em pacientes com o fenótipo clínico DII-símile com comportamento agressivo em crianças

(UHLIG et al., 2014). Em alguns pacientes com doenças monogênicas DII-símile, como na deficiência da IL10 e seus receptores, o tratamento é o transplante de células-tronco devido à resistência aos medicamentos habitualmente utilizados no tratamento da DII (BIANCO; GIRARDELLI; TOMMASINI, 2015; UHLIG et al., 2014). A diferença nos tratamentos de acordo com o polimorfismo e a doença monogênica apresentada aponta para a importância da investigação genética desses pacientes.

Deve-se enfatizar que os últimos estudos mostram que a incidência da DII muito precoce, entre elas a DII infantil, é de 4,37 /100.000 crianças (UHLIG et al., 2014). Apesar dos crescentes registros de pacientes com essa apresentação da DII, a herança poligênica ainda é considerada para esse grupo a mais provável, assim como para os demais grupos de DII pediátrica. O NOD2 continua a ser considerado como um gene que dá importante contribuição para a gênese da DII poligênica e com característica de corticorresistência, necessidade de intervenções cirúrgicas e doença complicada com fístulas e estenoses (GAZOULI et al., 2010; OLIVA-HEMKER et al., 2008; RUEMMELE et al., 2006).

A doença perianal e/ou fistulizante é descrita tanto nos defeitos da via de sinalização da IL10 quanto nos polimorfismos do NOD2 (BIANCO; GIRARDELLI; TOMMASINI, 2015; SHAOUL et al., 2009). Na nossa casuística, observamos a presença da doença perianal e da doença fistulizante na presença ou não de polimorfismos. Destaca-se que a maior frequência de polimorfismos e presença de doença perianal foi nos pacientes que tinham NOD2 presente (66,6%).

Nos últimos anos, a relação dos polimorfismos genéticos com a DII, assim como a presença de DC símile nas doenças com heranças monogênicas, tem sido alvo de muitos estudos (BEGUE et al., 2011; GLOCKER et al., 2010; GLOCKER et al., 2011; HUGOT et al., 2001; MORAN et al., 2013; VENEMA et al., 2017). Como foi feito neste estudo, polimorfismos já relacionados com a DII são avaliados em pacientes com fenótipo sugestivos destes polimorfismos, por exemplo, os pacientes que têm características sugestivas de deficiência de IL10. Essas associações têm permitido que alguns serviços optem por tratamentos mais efetivos para esses pacientes, realizando até transplantes de medula óssea como opção aos não respondedores ao tratamento atual (ENGELHARDT et al., 2013). No entanto, entre encontrar um polimorfismo de associação com um fenótipo característico até a determinação da sua responsabilidade com esse fenótipo, verifica-se a necessidade de confirmação da ação desse

polimorfismo na DII (BEGUE et al., 2011). Logo, para afirmar que determinado polimorfismo está causando o fenótipo agressivo ou não de DII em um paciente, é necessário realizar a avaliação funcional desse gene (MORAN et al., 2013; KOTLARZ et al., 2012).

A avaliação funcional permite visualizar a repercussão da alteração genética encontrada no fenótipo estudado. Ao fazer a avaliação de polimorfismos genéticos dos pacientes deste estudo, não foi realizada uma avaliação funcional, já que essa avaliação exige técnicas laboratoriais específicas e direcionadas à presença de repercussões inflamatórias devido à expressão anormal do gene pesquisado, como, por exemplo, a expressão de citocinas inflamatórias produzidas por ausência de expressão de genes de citocinas anti-inflamatórias. Muitos autores optam por “testar” a atividade do gene, verificando, por exemplo, se aquele polimorfismo apresentado gera *in vitro* uma reação inflamatória como aumento de TNF α ou aumento de IL6 após um estímulo com algum antígeno que gere essa reação (BEGUE et al., 2011). Essa avaliação exige tempo e mais custo ao estudo genético, mas é de fundamental importância para verificar uma causalidade genotípica e fenotípica (KAMMERMEYER et al., 2016; KOTLARZ et al., 2012). Uma vez essa causalidade determinada, pode-se definir melhor o entendimento do quadro clínico, e decisões terapêuticas podem ser mais facilmente tomadas. Contudo, essa prática ainda está longe da rotina de assistência dos pacientes com DII devido às suas limitações técnicas, financeiras e, porque não dizer, científicas. O que não suprime a sua importância no estudo contínuo das possíveis condições genéticas associadas à DII.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES

6.1 Uma reflexão sobre os achados do estudo

A complexidade dos pacientes foi percebida em cada etapa deste estudo, reflexo da heterogeneidade fenotípica da DII. Ao caracterizar a casuística, percebemos algumas situações peculiares, entre elas, a proporção importante de pacientes com doença de início precoce, em particular a forma Infantil, com comportamento mais agressivo e suas formas complicadas em muitos casos. Esse grupo de pacientes exige uma abordagem diferente com envolvimento de outras especialidades, como a imunologia e a genética, bem como a realização de um amplo diagnóstico diferencial.

Quanto aos sintomas, os pacientes da nossa casuística não foram diferentes do descrito na literatura, sendo a diarreia como sintoma mais frequente na maioria dos subgrupos avaliados. O comprometimento perianal também foi visto principalmente na DC Infantil. A demora entre o aparecimento dos sintomas e o diagnóstico, por sua vez, foi relevante. Os subgrupos nos quais os sintomas iniciais foram ditos como mais evidentes, como os que tinham doença perianal, foram os que apresentaram o diagnóstico mais precoce. Contudo, nos grupos onde a diarreia, a dor abdominal e a hematoquezia predominavam como sintomas iniciais mais referidos, o diagnóstico contou com atraso de 12, 24 ou mais de 48 meses. A conclusão acerca dessa observação é que a DII ainda não é um diagnóstico aventado com frequência entre os pediatras e a confusão diagnóstica com outras doenças é ainda evidente.

Na seara do diagnóstico, ressaltamos que, na maioria dos casos, a sintomatologia apresentada pelos pacientes justificaria a inclusão da DII no diagnóstico diferencial, fato não observado provavelmente pelo desconhecimento da doença pelos pediatras que fizeram os atendimentos iniciais. Um paciente com diarreia crônica, comprometimento pondero-estatural, hematoquezia, fístulas, abscessos ou febre, por exemplo, é um paciente que deve ser investigado, pois essas manifestações clínicas associadas com doenças potencialmente graves e de curso crônico exigem intervenções que garantam o crescimento e o bem-estar das crianças e adolescentes. Diante da nossa realidade social e econômica, as doenças infecciosas devem ser pensadas tanto como diagnóstico diferencial quanto como gatilhos para doenças crônicas, associadas a distúrbios imunológicos com a DII.

Ao iniciar este estudo, tínhamos em mente a soberania da clínica na condução dos pacientes, como tradicionalmente é valorizada na medicina. Não abandonamos esse conceito.

Os sintomas iniciais apresentados pelos pacientes guiaram para o diagnóstico mesmo que muitas vezes tardio. O reconhecimento dos seus períodos de atividade inflamatória tidos como recaída muitas vezes se dá a partir do ressurgimento dos sintomas. Entretanto, deve ser valorizada a avaliação complementar laboratorial e endoscópica no paciente com DII.

A análise dos pacientes do ponto de vista nutricional mostrou a complexidade dos casos e a não identificação de um padrão, uma vez que os pacientes se encontravam em diferentes momentos do processo de adoecimento e com diferentes intervenções medicamentosas. Diante dos resultados encontrados e da variedade de situações associadas ou não à atividade inflamatória, seria necessária uma avaliação nutricional que fosse além da avaliação antropométrica. Infelizmente não foi possível neste momento. No entanto, a sua importância não deve ser minimizada dada a necessidade de conhecimento acerca do metabolismo ósseo, por exemplo, do paciente com DII. Os perfis de micronutrientes devem ser traçados, tendo como exemplo a grande frequência de déficit de ferro e outros oligoelementos nesses pacientes. As consequências nutricionais do uso frequente de corticoides e da inflamação devem ser sistematicamente analisadas. Um dos objetivos do tratamento do paciente com DII é mantê-lo bem do ponto de vista nutricional e, para isso, devemos ir além da avaliação rotineira de peso e estatura.

Os escores de atividade inflamatória, tanto o PUCAI quanto o PCDAI, analisados no início do estudo, já apontavam para a importância da clínica na avaliação do paciente. Quando avaliamos a concordância da clínica com a atividade laboratorial, endoscópica e histológica verificamos um bom nível de concordância. Por outro lado, a presença de manifestações clínicas e a ausência de marcadores de inflamação chamaram a nossa atenção para a necessidade de considerar a síndrome do intestino irritável como provável explicação para os sintomas.

O estudo permitiu *olhar* para os pacientes de forma individualizada, onde suas particularidades foram vistas e valorizadas. A *medicina* cada vez mais tenta “estratificar”, “enquadrar” os pacientes em grupos levando a diagnósticos e condutas direcionadas. Essa prática ajuda a entender e atender de uma maneira eficiente a maior parte dos pacientes, porém, pode funcionar também como uma espécie de armadilha: alguns pacientes, se olhados de forma mais minuciosa, não se encaixariam nesses “estratos” ou “quadros”, mas acabam conduzidos de forma equivocada. Ao analisar alguns pacientes mais detalhadamente, pudemos perceber que cada paciente com DII é único e o que tentamos fazer é torná-los parecidos para seguirem

um padrão predeterminado de tratamento. Nem sempre essa prática vai resultar em sucesso e cabe ao médico assistente ter consciência de quanto o paciente com DII é peculiar, obrigando-se periodicamente a revisar suas condutas e postura diante de cada caso.

O papel dos exames complementares e a heterogeneidade do paciente com DII impulsionaram a busca de um padrão inflamatório relacionado à expressão de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias no tecido colônico. O resultado não mostrou um padrão compatível com a presença ou ausência de atividade inflamatória. Apesar de já descrito em vários estudos, o envolvimento de um grande grupo de citocinas na DII ainda é alvo de investigação. A diversidade no comportamento das citocinas dificulta a interpretação dos achados e, no momento, a sua aplicação como ferramenta diagnóstica ou de monitoramento da inflamação na prática médica rotineira. Os pacientes do estudo apresentaram resultados diversos em relação às citocinas, não sendo possível estabelecer uma relação com o quadro clínico e os outros exames complementares. O número de pacientes analisados e a ausência de um padrão comparativo ou um controle limitou essa análise.

Por último, a investigação de genes associados à DII nos pacientes permitiu estabelecer algumas características genéticas relacionadas aos dois genes testados: o NOD2 e a IL10 com os seus receptores. A escolha por esses genes foi motivada pela quantidade de estudos já descrevendo a associação e a presença de polimorfismos em alguns pacientes estudados. A possibilidade de fazer essa análise nos nossos pacientes era a chance de ter alguma informação genética dessa população carente de qualquer estudo genético prévio. Ao realizar este estudo, encontramos muitos polimorfismos, alguns descritos como patogênicos e com associação à DII já conhecida. Contudo, a grande maioria sem descrição anterior na literatura e, diante desses resultados, associados à falta de estudo funcional que permitisse analisar a expressão dos polimorfismos encontrados, os achados ficaram apenas como um registro.

A reflexão a partir da literatura existente sobre a análise de polimorfismos genéticos na DII permitiu chegar a essa interpretação nos alertando quanto à valorização muitas vezes equivocada de resultados de análise genética, valorizando a presença do polimorfismo sem a preocupação de analisar a sua expressão. Neste estudo, não foi possível estabelecer uma relação entre a presença do polimorfismo e a expressão do gene na mucosa. Em tempos em que cada vez mais temos acesso à avaliação molecular, o raciocínio crítico e ponderado deve ser sempre prioridade pelo risco de conclusões precipitadas e gastos emocionais e financeiros

desnecessários. O papel da análise genética do paciente com DII, apesar de parecer promissor e com repercussões positivas na definição terapêutica, ainda é incipiente.

Enfim, concluímos que o conhecimento das características de uma casuística é a base e o ponto de partida de qualquer estudo e primordial para definir o acompanhamento e a tomada de decisões terapêutica. O diagnóstico nutricional do paciente com DII deve fazer parte da rotina assistencial. As análises moleculares de citocinas em mucosa ou em sangue ainda carecem de valor para a prática clínica, todavia, a insistência em estudos é válida e deve se direcionar para busca de respostas, apesar de ainda distantes, para o diagnóstico e para a terapêutica da DII. O sonhado perfil genético dos pacientes com DII ainda não é possível como rotina devido às dificuldades técnicas e financeiras e de análise. O caráter poligênico e a necessidade de estudos funcionais ainda são um desafio para a interpretação clínica.

6.2 Recomendações

Iniciamos esta pesquisa com várias inquietações. Constatamos, ao finalizá-la, que algumas inquietações foram sanadas, mas um número maior de perguntas ficou sem resposta. O objetivo de elencá-las ao fim da escrita deste texto é estimular que outros se juntem a nós em busca dessas respostas. Sugerimos:

- A realização de inquéritos nacionais onde seja possível registrar os pacientes com DII visando construir um perfil com as características dos pacientes da DII nos países do hemisfério sul;
- A análise do perfil nutricional dos pacientes com DII de forma detalhada e, a partir da caracterização, propor abordagens regionalizadas, evitando aplicar condutas estabelecidas para pacientes do hemisfério norte sem uma análise crítica de sua adequação aos nossos pacientes;
- A investigação do papel das citocinas inflamatória e anti-inflamatória e sua aplicação na prática clínica;
- A análise do perfil genético dos pacientes com DII definindo sua importância em relação ao diagnóstico e/ou conduta.

REFERÊNCIAS

ABDALLA M.I.; SANDLER R.S.; KAPPELMAN M.D. et al. Prevalence and impact of inflammatory bowel disease-irritable bowel syndrome on patient-reported outcomes in CCFA parters. **Inflammatory Bowel Diseases**, Hoboken, v.23, n.2, p. 325-331, 2017.

ABDULLAH, M.; SYAM, A.F.; SIMADIBRATA, M. et al. New insights on the pathomechanisms of inflammatory bowel disease. **Journal of Digestive Diseases**, Carlton, v.14, p.455-462, 2013.

ABRAHAM, B.P.; MEHTA, S.; EL-SERAG, H.B. Natural history of pediatric-onset inflammatory bowel disease: a systematic review. **Journal of Clinical Gastroenterology**, Filadélfia, v.46, n.7, p.581-589, 2012.

ABRAHAM, C.; CHO, J.H. Inflammatory bowel disease. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 361, n.21, p. 2066-2078, 2009.

ABRAHAM, C.; MEDZHITOV, R. Interactions between the host innate immune system and microbes in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, Baltimore, v.140, n.6, p.1729-1737, 2011.

ABREU, M.T. NOD2 in normal and abnormal intestinal immune function. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 126, n. 4, p. 1302-1304, 2005.

ADLER J.; DONG S.; EDER, S.J. et al. Perianal Crohn's disease in a large multicenter pediatric collaborative. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Nova Iorque, v.64, n.5, p.e117-124, 2017.

ADZHUBEI I. A.; SCHMIDT S.; PESHKIN L. et al., A method and server for predicting damaging missense mutations. **Nature Methods**, Nova Iorque, v.7, p.248-249, 2010.

AHMED I.; ROY B. C.; KHAN S. A. et al. Microbiome, metabolome and inflammatory bowel disease. **Microorganisms**, Basel, v.4, n.2, [s.p.], 2016.

ALOI M.; NUTI, F.; STRONATI, L. et al. Advances in the medical management of paediatric IBD. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, London, v.11, p.99-108, 2014.

ASSA, A.; AMITAI, M.; GREER M. et al. Perianal pediatric Crohn's disease is associated with a distinct phenotype and greater inflammatory burden. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Nova Iorque, In Press. Disponível em http://journals.lww.com/jpgn/Abstract/publishahead/Perianal_Pediatric_Crohn_s_Disease_is_Associated.97202.aspx. Acesso em maio de 2017.

BALLOU, S.P.; KUSHNER, I. C-reactive protein and the acute phase response. **Advances in Internal Medicine**, Nova Iorque, v.37, p.313-336, 1992.

BAPTISTA, M.L.; AMARANTE, H.; PICHETH, G. et al. CARD 15 and IL23R influences Crohn's disease susceptibility but not disease phenotype in a Brazilian population. **Inflammatory Bowel Diseases**, Hoboken, v. 14, n.5, p. 674-679, 2008.

BEGUE, B.; VERDIER, J.; RIEUX-LAUCAT, F. et al. Defective IL10 signaling defining a subgroup of patients with inflammatory bowel disease. **The American Journal of Gastroenterology**, Bethesda, v. 106, n.8, p. 1544-1555, 2011.

BENCHIMOL E.I.; FORTINSKY K.J.; GOZDYRA P. et al. Epidemiology of pediatric inflammatory bowel disease: a systematic review of international trends. **Inflammatory Bowel Diseases**, Hoboken, v.17, n.1, p.423-439, 2011.

BENCHIMOL E.L.; MACK D.R.; NGUYEN G.C. et al. Incidence, outcomes, and health services burden of very early onset inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, Baltimore, v.147, n.4, p.803-813, 2014.

BEQUET, E.; SARTER, H.; FUMERY, M. et al. Incidence and phenotype at diagnosis of very-early-onset compared with later-onset paediatric inflammatory bowel disease: a population – based study (1988-2011). **Journal of Crohn's and Colitis**, Dorchester, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjw194>>. Acesso em: 25 mar. 2017.

BERRIL, J.R.; GREEN, J.T.; HOOD, K. et al. Symptoms of irritable bowel syndrome in patients with inflammatory bowel disease: examining the role of sub-clinical inflammation and the impact on clinical assessment of disease activity. **Alimentary pharmacology and therapeutics**, London, v.38, n.1, p.44-51, 2013.

BÄHLER, C.; SCHOEPPFER, A.M; VAVRICKA. S.R. et al. Chronic comorbidities associated with inflammatory bowel disease: prevalence and impact on healthcare costs in Switzerland. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, [s.l.]. [Epub ahead of print].

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Chronic+comorbidities+associated+with+inflammatory+bowel+disease%3A+prevalence+and+impact+on+healthcare+costs+in+Switzerland>
. Acesso em: 6 jun. 2017.

BIANCO A. M.; GIRARDELLI M.; TOMMASINI A. Genetics of inflammatory bowel disease from multifactorial to monogenic forms. **World Journal of Gastroenterology**, Pequim, v.21, n.43, p.12296-12310, 2015.

BOUSVAROS, A.; GOLD, B.D.; GRIFFITHS, A. M. et al. Clinical report: differentiating ulcerative colitis from Crohn disease in children and young adults: report of a working group of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition and the Crohn's and Colitis foundation of America. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Nova Iorque, v.44, p. 563-574, 2007.

BOYAPATI, R.K.; KALLA, R.; SATSANGI, J. et al. Biomarkers in Search of Precision Medicine in IBD. **American Journal of Gastroenterology**, Nova Iorque, v.111, n.12, p. 1682-1690, 2016.

CAMPOS, F.G.M.C.; KOTZE, P.G.. Burrill Bernard Crohn (1884-1983): o homem por trás da doença. **ABCD, Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, São Paulo , v. 26, n. 4, p. 253-255, 2013.

CASTRO, M.; PAPADATOU, B.; BALDASSARE M. et al. Inflammatory bowel disease in children and adolescents in Italy: data from the pediatric national IBD register (1996-2003). **Inflammatory Bowel Diseases**, Hoboken, v.14, n.9, p. 1246-1252, 2008.

CHEON, J. Genetics of inflammatory bowel diseases: a comparison between Western and Eastern perspectives. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, Melbourne, v. 28, n.2, p. 220-226, 2013.

CHRISTODOULOU, K.; WISKIN, A.E.; GIBSON, J. Next generation exome sequencing of paediatric inflammatory bowel disease patients identifies rare and novel variants in candidate genes. **Gut**, Londres, v.62, n.7, p. 977-984, 2013.

CHOY M.C.; VISVANATHAN K.; DE CRUZ P. An overview of the innate and adaptive immune system in inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, Hoboken, v.23, p. 2-13, 2017.

CHUN, S.; FAY, J.C. Identification of deleterious mutations within three human genomes. **Genome Research**, [s.l], v.19, n.9, p.1553-1561, 2009.

CIOFFI, M.; ROSA, A.; SERAO, R. et al. Laboratory markers in ulcerative colitis: Current insights and future advances. **World Journal of Gastroenterology**, Pequim, v.6, n.1, p.13-22, 2015.

CORFIELD, A.P.; WALLACE, H. M.; PROBERT, C.S.J. The molecular biology of inflammatory bowel diseases. **Biochemical Society Transactions**, London, v.39, p.1057-1060, 2011.

CORREA, I.; VENY, M.; ESTELLER, M. Defective IL-10 production in severe phenotypes of Crohn's disease. **Journal of Leukocyte Biology**, Bethesda, v.85, n.5, p.896-903, 2009.

CROHN, B.B.; GINZBURG, L.; OPPENHEIMER, G.D. Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. **JAMA**, Chicago, v.99, n.16, p. 1323-1329, 1932.

CRUVINEL W.M.; MESQUITA JUNIOR D.; ARAUJO J.A.P. et al. Sistema Imunitario – Parte I – Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v.50, n.4, p. 434-461, 2010.

DAPERNO M.; D'HAENS G.; VAN ASSCHE G. et al. Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD. **Gastrointestinal Endoscopy**, Downers Grove, v.60, n.4, p. 505-512, 2004.

DAPERNO M.; CASTIGLIONE F.; DE RIDDER L. et al. Results of the 2nd part Scientific Workshop of the ECCO. II: Measures and markers of prediction to achieve, detect, and monitor intestinal healing in inflammatory bowel disease. **Journal of Crohn's and Colitis**, Dorchester, v.5, p.484-498, 2011.

DE BIE C.; PAERREGAARD A.; KOLACEK, S et al. Disease phenotype at diagnosis in pediatric Crohn's disease: 5-year analyses of the EUOKIDS registry. **Inflammatory Bowel Diseases**, Hoboken, v. 19, n. 2, p.378-385, 2013.

DE CHAMBRUM, G.P.; BLANC P.; PEYRIN-BIROULET, L. Current evidence supporting mucosal healing and deep remission as important treatment goals for inflammatory bowel disease. **Expert Review of Gastroenterology and Hepatology**, s/l v.10, n.8, p.915-927, 2016.

DE MATOS V.; RUSSO P.A.; COHEN A.B. et al. Frequency and clinical correlations of granulomas in children with Crohn disease. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Nova Iorque, v. 46, p. 392-398, 2008.

DE RIDDER, L.; WEERSMA, R.K.; DIJKSTRA, G. et al. Genetic susceptibility has a more important role in pediatric-onset Crohn's disease than in adult-onset Crohn's disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, Hoboken, v.13, n.9, p.1083-1092, 2007.

DE ZOETEN, E. F.; PASTERNAK, B.A.; MATTEI, P. et al. Diagnosis and treatment of perianal Crohn disease: NASPGHAN clinical report and consensus statement. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Nova Iorque, v.57, n.3, p. 401-412, 2013.

D'HAENS G.; SANDBORN W.J.; FEAGAN B.G. A review of activity indices and efficacy end points for clinical trials of medical therapy in adults with ulcerative colitis. **Gastroenterology**, Baltimore, v.132, p.763-786, 2007.

DIAMANTI, A.; PANETTA, F.; BASSO, M.S. et al. Diagnostic work-up of inflammatory bowel disease in children: the role of calprotectin assay. **Inflammatory bowel diseases**, Hoboken, v.16, n.11, p.1926-1930, 2010.

DIEDEREN K.; HOEKMAN, D.R., BENNINGA, M.A. Letter: irritable bowel syndrome-type symptoms in paediatric inflammatory bowel disease - authors' reply. **Alimentary Pharmacology and Therapy**, [s.l.], v.44, n.3, p.309-310, 2016.

ENGELHARDT, K.R.; SHAH, N.; FAIZURA-YEOP, INTAN. Clinical outcome in IL-10- and IL-10 receptor-deficient patients with or without hematopoietic stem cell transplantation. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, Denver, v. 131, n.3, p. 825-830, 2013.

FAVA, F.; DANESE, S. Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease: friend of foe? **World Journal of Gastroenterology**, Pequim, v.17, n.5, p. 557-566, 2011.

FIGUEREDO, A.A.; MOTA, J.A.C.; PENNA, F.J. et al. Colite ulcerativa inespecífica em crianças e adolescentes: análise de casuística. **Revista Brasileira de Saúde Materno-Infantil**, Recife, v.4, n.3, p. 309-315, 2004.

FIOCCHI, C. Genes and 'in-vironment': how will our concepts on the pathophysiology of inflammatory bowel disease develop in the future? **Digestive diseases**, Basel, v.30, s.3, p.2-11, 2012.

FORBES, A.; ESCHER, J.; HÉBUTERNE, X. et al. ESPEN guideline: Clinical nutrition in inflammatory bowel disease. **Clinical Nutrition**, College Station, v.36, n.2, p.321-347, 2017.

FUKATA, M.; ABREU, M.T. Pathogen recognition receptors, cancer and inflammation. **Current Opinion in Pharmacology**, Oxford, v.9, p. 680-687, 2009.

GASPARETTO M.; GUARUSO G. Highlights in IBD epidemiology and its natural history in the paediatric age. **Gastroenterology Research and Practice**, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/829040>. Acesso em janeiro, 2017.

GAZOULI, M.; PACHOULA, I.; MANTZARIS, G. et al. NOD2 /CARD15, ATG16L1 and IL23R gene polymorphisms and childhood-onset of Crohn's disease. **World Journal of Gastroenterology**, Pequim, v. 16, n. 14, p. 1753-1758, 2010.

GEREMIA, A.; BIANCHIERI, P.; ALLAN, P. et al. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. **Autoimmunity Reviews**, Amsterdam, v.13, n.1, p.3-10, 2014.

GIBSON, R. S. Principles of nutritional assessment. Oxford: Oxford University Press, 1990.

GLOCKER, E.O.; FREDE, N.; PERRO, M. et al. Infant colitis--it's in the genes. **The Lancet**, London, v. 376, n. 9748, p. 1272, 2010.

GLOCKER, E.; GRIMBACHER, B. Inflammatory bowel disease: is it a primary immunodeficiency? **Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS**, Basel, v. 69, n.1, p. 41-48, 2012.

GLOCKER, E.O.; KOTLARZ, D.; BOZTUG, K. et al. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 361, n.21, p. 2033-2045, 2009.

GLOCKER, E.O.; KOTLARZ, D.; KLEIN, C. IL-10 and IL-10 receptor defects in humans. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1246, p. 102-107, 2011.

GREUTER, T.; BERTOLDO, F.; RECHNER, R. et al. Extraintestinal manifestations of pediatric inflammatory bowel disease: prevalence, presentation and anti-TNF treatment. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Nova Iorque, 2016. In Press. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27801751>. Acesso em janeiro, 2017.

GUAGNOZZI, D.; GONZÁLEZ-CASTILLO, S.; OLVEIRA, A. et al. Nutritional treatment in inflammatory bowel disease. An update. **Revista española de enfermedades digestivas**, Madrid, v.104, n.9, p.479-488, 2012.

GUZ-MARK, A.; RINAWI, F.; EGOTUBGY, O. et al. Pediatric-onset inflammatory bowel disease poses risk for low bone mineral density at early adulthood. *Digestive Liver Disease*, Epub ahead of print]. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Pediatriconset+inflammatory+bowel+disease+poses+risk+for+low+bone+mineral+density+at+early+adulthood>>. Acesso em: 6 jun. 2017.

GYRES, K.; TÓTH, É.V.; ZÁDORI, S. Z. Gut inflammation: current update on pathophysiology, molecular mechanism and pharmacological treatment modalities. **Current Pharmaceutical Design**, [s/l], v.20, n.7, p.1063-1081, 2014

HANAUER, S.; SCHWARTZ, J.; ROBINSON, M. et al. Mesalamine capsules for treatment of active ulcerative colitis: results of a controlled trial. Pentasa Study Group. **American Journal of Gastroenterology**, Nova Iorque, v.88, n.8, p. 1188-1197.

HERZOG D.; BUEHR P.; KOLLER R. et al. Gender differences in paediatric patients of the Swiss Inflammatory Bowel Disease cohort study. **Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition**, Seul, v.17, n.3, p.147-154, 2014.

HILDEBRAND H.; FINKEL Y.; GRAHNQUIST L. et al. Changing pattern of paediatric inflammatory bowel disease in northern Stockholm 1990-2001. **Gut**, Londres, v. 2, p.1432-1434, 2003.

HISAMATSU T.; KANAI T.; MIKAMI Y. et al. Immune aspects of the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Pharmacology and Therapeutics**, Kansas, v. 137, p. 283-297, 2013.

HOEKMAN D.R.; DIEDEREN K.; KOOT B.G. et al. Relationship of clinical symptoms with **biomarkers** of inflammation in pediatric inflammatory bowel disease. **European Journal of Pediatrics**, Heidelberg, v.175, n.10, p.1335-1342, 2016.

HOOPE K.M.; BARLOW P.G.; STEVENS C. et al. Inflammatory bowel disease drugs: a focus on autophagy. **Journal of Crohn's and Colitis**, Dorchester, v.11, n.1, p.118-127, 2017.

HOVDE Ø.; HØIVIK M.L.; HENRIKSEN M. et al. Malignancies in patients with inflammatory bowel disease: Results from 20 years of follow-up in the IBSEN study. **Journal of Crohn's and Colitis**, Dorchester, 2016. In press: Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27799270>>. Acesso em: 06 jan. 2017.

HUGOT, J.P.; CHAMARLLAID, M.; ZOUALI, H. et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. **Nature**, London, v. 411, n. 6837, p. 599-603, 2001.

HYAMS J.S., FERRY G.D., MANDEL F.S., et al. Development and validation of a pediatric Crohn's disease activity index. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Nova Iorque, v.12, n.4, p. 439-447, 1991.

HYAMS, J.; MARKOWITZ, J.; OTLEY, A. Evaluation of the pediatric crohn disease activity index: a prospective multicenter experience. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Nova Iorque, v. 41, n.4, p.416-421, 2005.

IPPOLITI, A.; DEVLIN, S.; MEI, L. et al. Combination of innate and adaptive immune alterations increased the likelihood of fibrostenosis in Crohn's disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, Hoboken, v.16, n.8, p.1279-1285, 2010.

ISKANDAR, H.; CIORBA, M. Biomarkers in inflammatory bowel disease: current practices and recent advances. **Translational Research**, Nova Iorque, v. 159, n.4, p. 313-325, 2012.

JELSNES-JØRGENSEN, L.P; BERNKLEV, T.MOUM, B. Calprotectin is a useful tool in distinguishing coexisting irritable bowel-like symptoms from that of occult inflammation among inflammatory bowel disease patients in remission. **Gastroenterology Research and Practice**, [s/l], v.2013, 2013.

KAMMERMEIER, J; DZIUBAK, R; PESCARIN, M. et al. Phenotypic and genotypic characterization of inflammatory bowel disease presenting before the age of two years. **Journal of Crohn's and Colitis**, Dorschester, 2016. In press. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27302973>>. Acesso em: 6 jan. 2017.

KAISER T.; LANGHORST J.; WITTKOWSKI H. et al. Faecal S100A12 as a non-invasive marker distinguishing inflammatory bowel disease from irritable bowel syndrome. **Gut**, Londres, v.56, p. 1706-1713, 2007.

KELLER K.M.; BENDER S.W.; KIRCHMANN H. et al. Diagnostic significance of epithelioid granulomas in Crohn's disease in children. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, New York, v. 10. p. 27-32, 1990.

KELSEN J.; DAWANY N.; MORAN C et al. Exome sequencing analysis reveals variants in primary immunodeficiency genes in patients with very early onset inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 149, p.1415-1424, 2015.

KELSEN J.R.; BALDASSANO, D.A.; SONNENBERG G.F. Maintaining intestinal health: the genetics and immunology of very early onset inflammatory bowel disease. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, Amsterdã, v.1, p.462-476, 2015.

KIM, B.J.; SONG, S. M.; KIM, K.M. et al. Characteristics and trends in the incidence of inflammatory bowel disease in Korean children: a single-center experience. **Digestive Diseases and Sciences**, Nova Iorque, v. 55, p. 1989-1995, 2010.

KIM, Y.J.; Nutricional concerns in pediatric inflammatory bowel disease. **Korean Journal of Pediatrics**, Seul, v.59, n.6, p. 247-251, 2016.

KODA, Y. K. L.; VIDOLIN, E.; MATTAR, R. C. et al. Patterns of bowel involvement in Brazilian children and adolescents with inflammatory bowel disease. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Nova Iorque, v.39, n. P0639, 2004.

KOMRAUS, M.; WOS, H.; WIECEK, S. et al. Usefulness of faecal calprotectin measurement in children with various types of inflammatory bowel disease. **Mediators of Inflammation**, [s.l], v. 2012, p.1-5, 2012.

KOSTAKIS, I.D.; CHOLIDOU, K.G.; VAIPOULOS, A.G. et al. Fecal calprotectin in pediatric inflammatory bowel disease: a systematic review. **Digestive Diseases and Sciences**, Nova Iorque, v.58, n.2, p.309-319, 2013.

KOTLARZ, D.; BEIER, R.; MURUGAN, D. et al. Loss of interleukin-10 signaling and infantile inflammatory bowel disease: implications for diagnosis and therapy. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 143, n.2, p.347-355, 2012.

KUMAR P.; HENIKOFF S.; NG P.C. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. **Nature Protocols**, Nova Iorque, v.4, p.1073-1081, 2009.

LACHER, M.; HELMBRECHT, J.; SCHROEPF, S. et al. NOD2 mutations predict the risk for surgery in pediatric-onset Crohn's disease. **Journal of Pediatric Surgery**, Indianapolis, v.45, n.8, p.1591-1597, 2010.

LANDRUM, M.J., LEE, J.M., RILEY G.R. et al. ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. **Nucleic Acids Research**, v. 42, Database issue, p.D980–D985, 2014.

LEACH S.T.; MESSINA I.; LEMBERG D.A. et al. Local and systemic interleukin-18 and interleukin-18-binding protein in children with inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Disease**, Hoboken, v.14, n.1, p.68-74, 2008.

LEES C.; BARRET J.; PARKES M. et al. New IBD genetics: common pathways with other diseases. **Gut**, Londres, v.60, n.12, p.1739-1753, 2011.

LEVINE A.; DE BIE C.; TUNER D. et al. Atypical disease phenotypes in pediatric ulcerative colitis: 5-year Analyses of the EUOKIDS registry. **Inflammatory Bowel Diseases**, Hoboken, v.19, n.2, p.370-377, 2013.

LEVINE, A.; GRIFFITHS, A.; MARKOWITZ, J. et al. Pediatric modification of the Montreal classification for inflammatory bowel disease: the Paris classification. **Inflammatory Bowel Diseases**, Hoboken, v. 17, n.6, p. 1314-1321, 2011.

LEVINE, A.; KOLETZKO, S.; TURNER, D. et al. The ESPGHAN revised Porto Criteria for the diagnosis of inflammatory bowel disease in children and adolescents. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Nova Iorque, v.58, p.795-806, 2014.

LEVINE, A.; KUGATHASAN, S.; ANNESE, V. et al. Pediatric onset Crohn's colitis is characterized by genotype-dependent age-related susceptibility. **Inflammatory Bowel Diseases**, Hoboken, v. 13, n. 12, p. 1509-1515, 2007.

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

LIMA, M.M.; SILVA, L.R.; FRANÇA, R.C.P. et al. Perfil de pacientes pediátricos com doença inflamatória intestinal atendidos em ambulatório de referência na cidade de Salvador. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v.12, n.3, p.337-343, 2013.

LINS, M.G.M.; MOTTA, M.E.F.A.; SILVA, G.A.P.. Fatores de risco para diarreia persistente em lactentes. **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo , v. 40, n. 4, p. 239-246, 2003 .

LOCKHART-MUMMERY H.E.; MORSON B.C. Crohn's disease (regional enteritis) of the large intestine and its distinction from ulcerative colitis. **Gut**, Londres, v.1, p.87, 1960.

LONG M.D.; CRANDALL W.V.; LEIBOWITZ I.H. et al. The prevalence and epidemiology of overweight and obesity in children with inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, Hoboken, v.17, n.10, p. 2162-2168, 2011.

LOUIS E. When is not inflammatory bowel disease: differential diagnosis. **Current Opinion Gastroenterology**, Boston, v.31, n.4, p.283-289, 2015.

MAGYARI, L.; KOVESDI, E.; SARLOS, P. et al. Interleukin and interleukin receptor gene polymorphisms in inflammatory bowel diseases susceptibility. **World Journal of Gastroenterology**, Pequim, v.20, n. 12, p. 3208-3222, 2014.

MALATY M.H.; FAN X.; OPEKUN A.R. et al. Rising incidence of inflammatory bowel disease among children: a 12-year study. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Nova Iorque, v. 50, n.1, p.27-31, 2010.

MALIK T. A. Inflammatory bowel disease: historical perspective, epidemiology and risk factors. **The Surgical Clinics of North America**, Chicago, v.95, n.6, p.1105-1122, 2015.

MARCUZZI, A.; GIRARDELLI, M.; BIANCO, A.M. et al. Inflammation profile of four early onset Crohn patients. **Gene**, Amsterdam, v.493, n.2, p.282-285, 2012.

MARLOW, G.J.; VAN GENT, D.; FERGUSON, L.R. Why interleukin-10 supplementation does not work in Crohn's disease patients. **World Journal of Gastroenterology**, Pequim, v. 19, n. 25, p. 3931-3941, 2013.

MATRICON J. Immuno- pathogénèse des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. **Medécine Science**, Montrouge, v. 26, n.4, p. 405-410, 2010.

MARY, J.Y.; MODIGLIANI, R. Development and validation of an endoscopic index of the severity for Crohn's disease: a prospective multicentre study. **Groupe d'Etudes Thérapeutiques des Affections Inflammatoires du Tube Digestif (GETAID)**. Gut, London, v.30, n.7, p. 983-989, 1989.

MENTZEL, H.; REINSCH, S.; KURZAI, M. et al. Magnetic resonance imaging in children and adolescents with chronic inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, Pequim, v.20, n.5, p.1180-1191, 2014.

MEZOFF E. A.; ALY H. The winding road to understanding the neonatal origins of inflammatory gastrointestinal disorders. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Nova Iorque, v.57, p. 543-549, 2013.

MOLODECKY, N.A.; SOON, S.Y.; RABI, D. M. et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time based, on systematic review. **Gastroenterology**, Baltimore, v.142, p.46-54, 2012.

MONIUSZKO, A.; WIŚNIEWSKA A.; RYDZEWSKA G. Biomarkers in management of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology Review**, Varsóvia, v.8, n.5, p. 5275-5283, 2013.

MORAN, C.J.; WALTERS, T.D.; GUO, C. et al. IL-10R Polymorphisms are associated with very-early-onset ulcerative colitis. **Inflammatory Bowel Diseases**, Hoboken, v.19, n.1, p.115-123, 2013.

MORAN C.; SHEEHAN D.; SHANAHAN F. The changing phenotype of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology Research and Practice**. 2016:1619053. doi: 10.1155/2016/1619053. Review.

MOSLI M.H.; ZOU G.; GARG S.K. et al. C-Reactive protein, fecal calprotectin, and stool lactoferrin for detection of endoscopic activity in symptomatic inflammatory bowel disease patients: A systematic review and meta-analysis. **American Journal of Gastroenterology**, Nova Iorque, v.110, n.6, p. 802-819, 2015.

MÜLLER K.E.; LAKATOS P.L.; KOVACS J.B. et al. Baseline characteristics and disease phenotype in inflammatory bowel disease. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Nova Iorque, v.62, n.1, p.50-55, 2016.

MUMY, K. L.; MCCORMICK, B. A. The role of neutrophils in the event of intestinal inflammation. **Current opinion in pharmacology**, Chapel Hill, v.9, p.697-701, 2009.

MUISE, A. M.; SNAPPER, S. B.; KUGATHASAN, S. The age of gene discovery in very early onset inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, Baltimore, v.143, n.2, p.285-288, 2012.

MÚZES, G.; MOLNÁR, B.; TULASSAY, Z. Changes of the cytokine profile in inflammatory bowel diseases. **World Journal of Gastroenterology**, Pequim, v.18, n.41, p. 5848-5861, 2012.

NASIR, B.F.; GRIFFITHS, L.; NASIR, A. et al. Perianal disease combined with NOD2 genotype predicts need for IBD-related surgery in Crohn's disease patients from a population-based cohort. **Journal of Clinical Gastroenterology**, Philadelphia, v. 47, n.3, p.242-245, 2013.

NG S.C.; BERNSTEIN C. N.; VATN M. H. et al. Geographical variability and environmental risk factors in inflammatory bowel disease. **Gut**, Londres, v.62, n.4, p.630-649, 2013.

NUTI, F.; CIVITELLI, F.; BLOISE, S. et al. Prospective evaluation of the achievement of mucosal healing with anti-TNF- α therapy in a paediatric Crohn's disease cohort. **Journal of Crohn's and Colitis**, Dorchester, [s.v.], p.5-12, 2016.

OLIVA-HEMKER, M.; ESCHER, J. C.; MOORE, D. et al. Refractory inflammatory bowel disease in children. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Nova Iorque, v.47, n.2, p. 266-272, 2008.

ÖZTÜRK, Z.A.; DAG, M.S.; KUYUMCU, M.E. et al. Could platelet indices be new biomarkers for inflammatory bowel diseases? **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**. [s.l], v.17, p.334-341, 2013.

PALLE S.K.; PRASAD M.; KUGATHASAN S. Approach to a child with colitis. **Indian Journal of Pediatrics**, Nova Deli, v. 83, n.12, p. 1444-1451, 2016.

PARK J. H.; PEYRIN-BIROULET L.; EISENHUT M. et al. IBD immunopathogenesis: A comprehensive review of inflammatory molecules. **Autoimmunity reviews**, Amsterdam, 2017. In press. Disponível em: <[https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568-9972\(17\)30053-8](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568-9972(17)30053-8)>. Acesso em: 23 jan. 2017.

PASTORELLI, L.; DE SALVO, C.; MERCADO, J.R. Central role of the gut epithelial barrier in the pathogenesis of chronic intestinal inflammation: lessons learned from animal models and human genetics. **Frontiers in Immunity**, Lausanne, v.4, n.280, p. 1-22, 2013.

PAUL, G.; KHARE, V.; GASCHE, C. Inflamed gut mucosa: downstream of interleukin-10. **European Journal of Clinical Investigation**, Berlim, v. 42, n.1, p.95-109, 2012.

PENAGINI F.; DILILLO D.; BORSANI B. et al. Nutrition in pediatric inflammatory bowel disease: from etiology to treatment. A systematic review. **Nutrients**, Basel, v.8, n.6, p.334-347, 2016.

PFEFFERKORN, M.D.; BOONE, J.H.; NGUYEN, J.T. et al. Utility of fecal lactoferrin in identifying Crohn disease activity in children. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Nova Iorque, v.51, n.4, p. 425-428, 2010.

PIGNEUR B.; SEKSIK, P.; VIOLA, S. et al. Natural history of Crohn's disease: comparison between childhood- and adult-onset disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, Hoboken, v.16, n.6, p.953-961, 2010.

PIGNEUR, B.; ESCHER, J.; ELAWAD, M. et al. Phenotypic characterization of very early-onset IBD due to mutations in the IL10, IL10 receptor alpha or beta gene: a survey of the GENIUS Working group. **Inflammatory Bowel Diseases**, Hoboken, v.19, n.13, p.2820-2828, 2013.

PITUCH-ZDANOWSKA, A.; BANASZKEIWICZ, A.; DZIEKIEWICZ, M. et al. Overweight and obesity in children with newly diagnosed inflammatory bowel disease. **Advances in Medical Sciences**, Bialystok, v.61, n.1, p.28-31, 2016.

QUILICI, F.A.; QUILICI, L.C.M. História da doença inflamatória intestinal. In: Cardozo, W. S.; Sobrado, C. W. **Doença Inflamatória Intestinal**. Barueri: Ed. Manole, 2012. p.1-10.
RICANEK, P.; BRACKMANN, S.; PERMINOW, G. Evaluation of disease activity in IBD at the time of diagnosis by the use of clinical, biochemical, and fecal markers. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, Oslo, v.46, n.9, p.1081-1091, 2011.

RIEDER, F.; FIOCCHI, C. Mechanisms of tissue remodeling in inflammatory bowel disease. **Digestive Diseases**, Basel, v.31, n.2, p.186-193, 2013

RIMMER, A.; PHAN, H.; MATHIESON, I. et al. Integrating mapping, assembly and haplotype based approaches for calling variants in clinical sequencing applications. **Nature Genetics**, Nova Iorque, v.46, p.912-918, 2014.

ROSENBERG, L.; NANDA K.; ZENLEA, T. et al. Histologic makers on inflammation in patients with ulcerative colitis in clinical remission. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, Houston, v.11, n.8, p.991-996, 2013.

RUEMMELE F.; EL KHOURY, M.G.; TALBOTEC C. et al. Characteristics of inflammatory bowel disease with onset during the first year of life. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Nova Iorque, v. 43, n. 5, p. 603-609, 2006.

RUEMMELE F. Pediatric inflammatory bowel diseases: coming of age. **Current Opinion in Gastroenterology**, Boston, v.26, p.332-336, 2010.

RUEMMELE F.; VERES G.; KOLHO K. et al. Consensus guidelines of ECCO/ESPGHAN on the medical management of pediatric Crohn's disease. **Journal of Crohn's and Colitis**, Dorchester, v.8, n.10, p.1179-1207, 2014.

SARTOR R.B.; WU G.D. Roles for intestinal bacteria, viruses, and fungi in pathogenesis of inflammatory bowel diseases and therapeutic approaches. **Gastroenterology**, Baltimore, v.152, p. 327-339, 2017.

SAUBERMANN L.J.; DENEAU M.; FALCONE R.A. et al. Hepatic issues and complications associated with inflammatory bowel disease. A clinical report from the NASPGHAN Inflammatory Bowel Disease and Hepatology Committees. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, New York, 2016. In Press. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27984347>>. Acesso em: 13 nov, 2017.

SAUER C.G.; KUGATHASAN S. Pediatric inflammatory bowel disease: highlighting pediatric differences in IBD. **Gastroenterology Clinics of North America**, Filadelfia, v.38, p. 611-628, 2009.

SCHIRBEL, A.; FIOCCHI C. Inflammatory bowel disease: established and evolving considerations on its etiopathogenesis and therapy. **Journal of Digestive Diseases**, Carlton, v. 11, p. 266-276, 2010.

SCHWARTZENTRUBER J.; KORSHUNOV A.; LIU X. et al. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. **Nature**, Nova Iorque, v.482, p.226-231, 2012.

SEO, J.K.; YEON, K.M.; CHI, J.G. Inflammatory bowel disease in children - clinical, endoscopic, radiologic and histopathologic investigation. **Journal of Korean Medical Science**, Seul, v.7, n.3, p.221-235, 1992.

SDEPANIAN, V. L.; LOPES, L. H. C.; UESUGUI, D. et al. Tendência da doença inflamatória intestinal em serviço especializado de Gastroenterologia Pediátrica no município de São Paulo-Brasil: análise do período de 1991-2004. In: 16º Congresso Latinoamericano, 7º congresso Iberoamericano, 1º Congreso Colombiano de Gastroenterología, Hepatología e Nutrición Pediátrica, 2005, Cartagena. **Anais do Congresso**. Cartagena: Med Unab, 2005.

SHAMIR, R. Nutritional aspects in inflammatory bowel disease. **Journal of pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Nova Iorque, v.48, n3, p.S86-S88, 2009.

SHAOUL, R.; KARBAN, A.; REIF, S. et al. Disease behavior in children with Crohn's disease: the effect of disease duration, ethnicity, genotype, and phenotype. **Digestive d Diseases and Sciences**, Nova Iorque, v.54, n.1, p.142-150, 2009.

SHERRY S. T.; WARD M. H.; KHOLODOV M. et al. DbSNP: the NCBI database of genetic variation. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.29, p.308-311, 2001.

SIDDIKI, H.; FIDLER, J. MR imaging of the small bowel in Crohn's disease. **European Journal of Radiology**, [s.l.], v.69, p.409-417, 2009.

SILVERBERG M.S.; SATSANGI J.; AHMAD T. et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. **Canadian Journal of Gastroenterology**, Montreal, v.19, p.5-36, 2005.

SLEBIODA TJ; ZBIGNIEW K. Tumour necrosis factor superfamily members in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Mediators of Inflammation**, [s/l], v.2014, p.325129, 2014.

STRONATI L.; NEGRONI A.; PIERDOMENICO M. et al. Altered expression of innate immunity genes in different intestinal sites of children with ulcerative colitis. **Digestive and Liver Disease**, Milão, v.42, n.12, p. 848-853, 2010.

TANAKA T.; KISHIMOTO T. The biology and medical implications of Interleukin-6. **Cancer Immunology Research**, Filadélfia, v.2, n.4, p.288-294, 2014.

TORKZAD, M.; ULLBERG, U.; NYSTRÖM, N. et al. Manifestations of small bowel disease in pediatric Crohn's disease on magnetic resonance enterography. **Inflammatory Bowel Diseases**, Hoboken, v.18, n.3, p.520-528, 2012.

TURNER, D.; HYAMS, J.; MARKOWITZ, J. et al. Appraisal of the pediatric ulcerative colitis activity index (PUCAI). **Inflammatory Bowel Diseases**, Hoboken, v.15, n.8, p.1218-1223.

TURNER, D.; LEVINE, A.; ESCHER, J.C. Management of pediatric ulcerative colitis: Joint ECCO and ESPGHAN Evidence-based Consensus Guidelines. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Nova Iorque, v. 55, n. 3, p.340-361, 2012.

TURNER, D; MACK D.R.; HYAMS J. et al. C-reactive protein (CRP), erythrocyte sedimentation rate (ESR) or both? A systematic evaluation in pediatric ulcerative colitis. **Journal of Crohn's and Colitis**, Dorchester, v.5, p.423-429, 2011.

TURNER, D.; MUISE, M. Editorial very early onset IBD : how very different 'on average'? **Journal of Crohn's and Colitis**, 2017. In Press. Disponível em: <https://academic.oup.com/ecco-jcc/article/2896749/Very-Early-Onset-IBD-How-Very-Different-on-Average>. Acesso em março, 2017.

TURNER, D.; OTLEY, A.R.; MACK, D. et al. Development, validation, and evaluation of a Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index: A prospective multicenter study. **Gastroenterology**, Baltimore, v.133, p. 423–432, 2007.

TURUNEN, P.; KOLHO, K.L.; AUVINEN A. et al. Incidence of inflammatory bowel disease in Finnish children, 1987–2003. **Inflammatory Bowel Diseases**, Hoboken, v. 12, n. 8, p. 677–683, 2006.

TRUELOVE, S.C.; RICHARDS, W.C. Biopsy studies in ulcerative colitis. **British Medical Journal**, [s.l.], v.1, n.4979, p. 1315-1318, 1956.

UHLIG H.H.; SCHWERD T.; KOLETZKO S. et al. The diagnostic approach to monogenic very early onset inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 147, p.990-1007, 2014.

VELIKOVA, T.; KYURKCHIEV, D.; SPASSOVA Z. et al. Alterations in cytokine gene expression profile in colon mucosa of inflammatory bowel disease patients on different therapeutic regimens. **Cytokine**, Mariland, v.92, p.12-19, 2017.

VENEMA W.T.C.U.; VOSKUIL M.D.; DIJSKTRA G. et al. The genetic background of inflammatory bowel disease: from correlation to causality. **Journal of Pathology**, Chichester, v. 241, p. 146-158, 2017.

VERDIER, J.; BEGUE, B.; CERF-BENSUSSAN, N. et al. Compartmentalized expression of Th1 and Th17 cytokines in pediatric inflammatory bowel diseases. **Inflammatory bowel diseases**, Hoboken, v.18, n.7, p.1260-1266, 2012.

VIGNAL, C.; SINGER E.; PEYRIN-BIROULET, L. et al. How NOD2 mutations predispose to Crohn's disease? **Microbes and Infection**, Paris, v.9, p. 658-663, 2007.

VILLANACCI, V.; ANTONELLI, E.; GEBOES, KAREL; et al. Histological healing in inflammatory bowel disease: a still unfulfilled promise. **World Journal of Gastroenterology**, Pequim, v.19, n.7, p.968-978, 2013.

WANG K.; Li M.; HAKONARSON H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.38, p.e164, 2010.

WANG, D.; DUBOIS, R.N.; RICHMOND, A. The role of chemokines in intestinal inflammation and cancer. **Current opinion in pharmacology**, Oxford, v.9, n.6, p.688-696, 2009.

WAUGH, N.; CUMMINS, E.; ROYLE, P. et al. Faecal calprotectin testing for differentiating amongst inflammatory and non-inflammatory bowel diseases: systematic review and economic evaluation. **Health Technology Assessment**, Winchester, v.17, n.55, p.15-19, 2013.

WIECH P.; BINKOWSKA-BURY M.; KORCZOWSKI B. Body composition as an indicator of the nutritional status in children with newly diagnosed ulcerative colitis and Crohn's disease – a prospective study. **Gastroenterology Review**, Varsóvia, v.12, n.1, p.55-59, 2017.

YANAGI, T.; MIZUOCHI, T.; TAKAKI, Y. Novel exonic mutation inducing aberrant splicing in the IL10RA gene and resulting in infantile-onset inflammatory bowel disease: a case report. **BMC Gastroenterology**. [s.l.], v.16, p. 3-8, 2016.

YOUNG, B.; GLEESON, M.; CRIPPS, A.W. C-reactive protein: a critical review. **Pathology**, London, v.23, n.2, p.118-124, 1991.

ZALLOT C.; PEYRIN-BIROULET L. Deep remission in inflammatory bowel disease: looking beyond symptoms. **Current Gastroenterology Reports**, Florida, v.15, n.3, p.315-321, 2013.

ZHOU, Y.; HUANG, Y. Inflammatory bowel disease in Chinese children: A retrospective analysis of 49 cases. **Experimental and Therapeutic Medicine**, [s.l.], v.12, p.3363-3368, 2016.

1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM, ABECASIS G.R., AUTON A., BROOKS L.D., et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. **Nature**, Nova Iorque, v.491, p.56-65, 2012.

APÊNDICE A

ARTIGO 1

Doença inflamatória intestinal em crianças acompanhadas em um hospital terciário na cidade do Recife¹.

Inflammatory bowel disease in children from a tertiary Hospital in Recife city

Michela C da Rocha Marmo†£, Kátia Galeão Brandt§, Gisélia Alves P Silva§

† Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

£ Serviço de Gastroenterologia Pediátrica do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP)

§ Departamento Materno-Infantil do Centro de Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Conflitos de interesse: nada a declarar

Correspondência para Michela Cynthia da Rocha Marmo
Rua Engenheiro Sampaio, 218, ap1402, Rosarinho, Recife-PE
CEP 52041-020
Telefone: 081 30725317
Endereço eletrônico: michelamarmo@gmail.com

¹ Artigo formatado conforme as normas da Revista Brasileira de Saúde Materno-Infantil

RESUMO

Objetivo: descrever um grupo de pacientes com doença inflamatória intestinal do ambulatório de gastroenterologia pediátrica em um hospital terciário da cidade do Recife.

Método: estudo tipo Série de Casos envolvendo crianças e adolescentes com DII 0 a 17 anos. O critério de inclusão foi ter o diagnóstico de DII definido. A coleta foi realizada através de consulta dos prontuários e do preenchimento de um formulário após entrevista com os pacientes e seus responsáveis. **Resultados:** dos 66 pacientes, verificou-se que 37,9% (25/66) tinham DC e 62,1% (41/66) tinham RU, sendo 60% (15/25) e 56% (23/41) do sexo masculino, respectivamente. A mediana de idade foi de 120,5 meses, o grupo de pacientes com DC tinha mediana de idade mais baixa (96 meses) do que a dos pacientes com RU (134 meses). Os pacientes com DC tiveram início mais precoce dos sintomas, tendo menor mediana de idade de início dos sintomas (12 meses) e menor mediana de idade do diagnóstico (60 meses), quando comparados aos pacientes de RU. A maioria dos pacientes era do interior do estado de Pernambuco. **Conclusões:** o conhecimento sobre o perfil dos pacientes acompanhados reflete na qualidade de atendimento destes. Destas informações pode-se identificar problemas a serem investigados em novas pesquisas assim como promover ações para a melhor assistência.

Descritores: doença inflamatória intestinal, crianças, adolescentes.

ABSTRACT

Objective: to describe a group of patients with inflammatory bowel disease in a pediatric gastroenterology clinic at a tertiary hospital in the city of Recife. **Method:** A series of case studies involving children and adolescents with IBD 0 to 17 years. The inclusion criterion was to have the diagnosis of IBD defined. The collection was done by consulting the medical records and completing a form after an interview with the patients and their caregivers. **Results:** Of the 66 patients, 37.9% (25/66) had CD and 62.1% (41/66) had UC, being 60% (15/25) and 56% (23/41) respectively. The median age was 120.5 months, the group of patients with CD had a median age lower (96 months) than that of patients with UC (134 months). Patients with CD had an earlier onset of symptoms, with a median age at onset of symptoms (12 months) and a median age at diagnosis (60 months), when compared to patients in UC. The majority of the patients were from the interior of the state of Pernambuco. **Conclusions:** the knowledge about the profile of patients followed reflects on the quality of care of these patients. From this information one can identify problems to be investigated in new researches as well as to promote actions for the best assistance.

Descriptors: inflammatory bowel disease, children, adolescents.

Introdução

Hoje se sabe que a DII consiste em um grupo de doenças, com evolução crônica e períodos de agudização relacionados à ativação de um processo inflamatório no trato gastrointestinal. A doença inflamatória intestinal engloba três apresentações fenotípicas: a doença de Crohn, a retocolite ulcerativa e a colite indeterminada. Define-se a doença de Crohn (DC) como uma inflamação granulomatosa que pode acometer todo o trato gastrointestinal de forma descontínua, estendendo-se da mucosa até às serosas (transmural); e a retocolite ulcerativa (RU), como uma inflamação não-granulomatosa restrita ao cólon, de caráter contínuo e que é limitada à mucosa. A denominação de colite indeterminada (CI) é reservada àqueles casos em que, mesmo após todo o processo de investigação diagnóstica, o paciente não preenche nos critérios diagnósticos de DC ou de RU ¹.

A incidência em adultos é estimada em torno de 200 casos de DC e 240 casos de RU para 100 mil habitantes em países desenvolvidos, sendo observado um aumento da incidência de DC nos últimos anos ². Embora os estudos epidemiológicos ainda sugiram uma maior ocorrência da DII em países ocidentais, os dados asiáticos mostram que a doença está aumentando rapidamente nessa região ³. Atualmente, a maior incidência da DII ocorre nos países do hemisfério norte, como os Estados Unidos, Canadá e países europeus⁴, e com um pico em torno da segunda década de vida e outro após os 60 anos. Chama atenção que aproximadamente 25% dos casos têm início na faixa etária pediátrica⁵.

De uma maneira geral, o curso clínico característico da DII, tanto na DC quanto na RU, consiste em sinais e sintomas associados com atividade inflamatória intercalada por períodos de remissão. Nos períodos de atividade inflamatória, a mucosa intestinal exhibe alterações que variam segundo a intensidade da agressão e o fenótipo da doença. Observa-se períodos de

diarreia, enterorragia, dor abdominal, febre, perda de peso, dores articulares, entre outras queixas. No âmbito laboratorial, os biomarcadores de atividade inflamatória sanguínea e fecal mostram-se alterados: aumento da velocidade de hemossedimentação (VHS), da proteína C-reativa (PCR), da calprotectina fecal, dentre outros⁵.

Métodos

Tratou-se de um estudo tipo Série de Casos envolvendo um grupo de crianças e adolescentes com DII – doença de Crohn (DC) e retocolite ulcerativa (RU) – com idade até 17 anos regularmente acompanhados no Ambulatório de Gastroenterologia Pediátrica do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP).

O critério de inclusão foi ter o diagnóstico de DII definido conforme os critérios de Porto revisados¹. Foram excluídos os pacientes caracterizados como colite indeterminada devido ao pequeno número de casos e possibilidade de falha no diagnóstico. Foram aplicados formulários para os pacientes e para os pais, além de consulta de dados contidos no prontuário.

Os sujeitos do estudo foram subcategorizados ou definidos com o objetivo de melhor analisar as suas particularidades descritas nos itens a seguir.

Quanto à idade de aparecimento dos primeiros sintomas

- Forma infantil: pacientes com DC ou RU com início de sintomas antes dos 2 anos de idade.
- Precoce: pacientes com DC ou RU com início dos sintomas entre 2 e 10 anos de idade.

- Tardia: pacientes com DC ou RU com início dos sintomas com mais de 10 anos de idade.

Quanto aos fenótipos clínicos da DC¹

- Inflamatória – doença inflamatória não complicada sem evidência de doença estenosante ou penetrante.
- Doença estenosante – doença com estreitamento luminal diagnosticado por exames radiológicos, endoscópicos ou em procedimentos cirúrgicos combinados com dilatação pré-estenótica ou sinais ou sintomas de obstrução sem evidências de doença fistulizante.
- Doença penetrante – ocorrência de perfuração intestinal e/ ou fistulas intra-abdominais.
- Doença estenosante/penetrante – presença do fenótipo estenosante e penetrante no mesmo paciente, ao mesmo tempo ou separadamente.
- Doença complicada – pacientes com as formas estenosantes, fistulizantes e/ou com doença perianal.

Quanto ao fenótipo clínico da RU

Os pacientes com RU foram classificados quanto ao fenótipo clínico baseados na Classificação de Paris⁸, de acordo com a extensão, variando em E 1 a E4 e com a gravidade em S0 ou S1.

Resultados

Foram recrutados 74 pacientes, dos quais 66 preencheram critérios para a inclusão na pesquisa. Dos 66 pacientes incluídos, verificou-se que 37,9% (25/66) tinham diagnóstico de DC e 62,1% (41/66) tinham diagnóstico de RU, sendo 60% (15/25) e 56% (23/41) do sexo masculino, respectivamente. A mediana de idade foi de 120,5 meses, sendo que o grupo de pacientes com DC tinha mediana de idade mais baixa (96 meses) do que o dos pacientes com RU (134 meses). Os pacientes com DC também tiveram início mais precoce dos sintomas, tendo menor mediana de idade de início dos sintomas (12 meses) assim como da mediana de idade do diagnóstico (60 meses), quando comparados aos pacientes de RU.

A maioria dos pacientes era proveniente do interior do estado de Pernambuco, sendo estes 59% (39/66) dos pacientes. Os demais pacientes foram 32% (21/66) da Região Metropolitana do Recife e 9% (6/66) de estados vizinhos do Nordeste. Na Tabela 1, as características dos pacientes, distribuídas de acordo com a idade de início, são apresentadas de forma mais detalhada.

Tabela 1 – Características de 66 crianças com diagnóstico de doença inflamatória intestinal, de acordo com os subgrupos etários.

Tipo de DII	DC			RU		
	Infantil	Precoce	Tardio	Infantil	Precoce	Tardio
Idade						
N (%)	14 (56%)	7 (28%)	4 (16%)	8 (19,5%)	27 (65,8%)	6 (14,7)
Idade atual	60,57	111	172	56	90	173
Mediana (variação)	(5-138)	(96-178)	(164-210)	(34-168)	(62-204)	(121-181)
Idade de início dos sintomas						
Mediana (variação)	5,82 (0-19)	42 (24-60)	162,5 (131-168)	9,5 (0-23)	58,5 (24-109)	140 (120-60)
Idade no diagnóstico						
Mediana (variação)	24,43 (4-104)	96 (48-144)	170,5 (131-180)	44,5 (34-108)	60,5 (36-144)	171 (121-80)
Classificação N(%)						
Inflamatória	4 (28,6)	4 (57,1)	2 (50)			
Estenosante	3 (21,4)	1 (14,3)	0	-	-	
Fistulizante	7 (50)	2 (28,6)	2 (50)			
Tempo de acompanhamento						
<6 meses	4 (28,6)	3(21,4)	2 (50)	2 (25)	0	3 (50)
6-24 meses	2 (14,3)	2 (28,6)	0	0	5 (18,5)	2 (33,3)
24-60 meses	5 (35,7)	0	0	3 (37,5)	13 (43,1)	1 (16,7)
≥60 meses	2 (28,6)	3 (42,8)	2 (50)	3 (37,5)	9 (33,3)	0
PCDAI ou PUCAI * N(%)						
Remissão	6 (42,9)	4 (57,1)	1 (50)	5 (62,5)	22 (81,5)	5 (83,3)
Leve	5 (35,7)	2 (28,6)	2 (50)	2 (25)	2 (7,4)	1 (16,7)
Moderada	1 (7,1)	1 (14,3)	0	1 (12,5)	3 (11,1)	0
Grave	2 (14,3)	0	1 (25)	0	0	0

Dos pacientes classificados como subgrupo Infantil (início dos sintomas antes de 2 anos de idade), oito apresentaram sintomas antes dos 3 meses de idade, destes, seis tinham o diagnóstico de DC e dois de RU.

Os pacientes com DC do subgrupo Infantil apresentaram com mais frequência os tipos fistulizante ou estenosante, somando 71,4% dos casos. Os pacientes com DC do subgrupo Precoce apresentaram predomínio de apresentação do tipo inflamatório (57,1% dos casos) (Tabela 1).

A casuística do estudo foi formada por crianças com diferentes tempos de acompanhamento no serviço, sendo 43/66 (65,1%) dos pacientes tinham mais de dois anos de seguimento. Havia 11 pacientes que estavam sendo acompanhados por menos de seis meses, sendo que dez destes eram acompanhados por menos de três meses após o diagnóstico, ou seja, estavam ainda tratando a atividade inflamatória da doença.

Quando avaliados pelos índices de atividade inflamatória (PUCAI para RU e PCDAI para DC), encontrou-se 65,1% (43/66) dos pacientes em remissão da DII. Entretanto, no subgrupo de pacientes com DC Infantil 57,1% dos pacientes apresentavam atividade inflamatória. O subgrupo que tinha a menor proporção de pacientes em atividade, segundo esses índices, era o de RU com mais de 10 anos, sendo apenas 16,7% dos pacientes.

A Tabela 2 apresenta os sintomas relatados pelos pacientes ou seus responsáveis no início da doença. A diarreia foi o sintoma mais frequentemente relatado tanto na DC quanto na RU. Nos pacientes com DC, acometeu 78,6% dos pacientes da forma Infantil e 100% da Precoce, enquanto que nos pacientes com RU, 75% da forma Infantil e 92,6,8% da Precoce.

Nos pacientes com DC Infantil, ocorreu comprometimento pondero-estatural em mais da metade das crianças (57,1%) e 42,9% relatou hematoquezia, enquanto que dor

abdominal não foi uma queixa frequente. Já a doença perianal chamou atenção por sua frequência superior à observada entre os portadores de DC. Esse grupo de pacientes, por sua vez, queixou-se de dor abdominal com maior frequência em 81,8% dos casos (81,8% vs 28,67%, $p=0,01$), seguida de comprometimento pondero-estatural em 64%. O comprometimento foi frequente em todos os pacientes com DC, chegando a 100% dos casos no subgrupo Tardio. A febre, sintoma pouco frequente nos demais subgrupos, foi observada mais frequentemente no subgrupo de DC Tardio em 50% dos casos (Tabela 2).

Quanto aos portadores de RU, no subgrupo de RU Infantil destaca-se que a hematoquezia foi referida com frequência elevada, em 75% dos casos, igualando-se com a diarreia. Nos subgrupos com RU Precoces e Tardios, a diarreia se destaca como sintoma frequente, em 92,6% e 60%, respectivamente. A dor abdominal foi mais relatada nos pacientes do subgrupo Tardio, em 80% dos casos (Tabela 2).

Tabela 2 – Descrição dos sintomas iniciais de 66 crianças e adolescentes com doença inflamatória intestinal.

Sintoma	DC (N= 25)				RU (N=41)				Total
									N= 66
	Infantil	Precoce	Tardia	p [£]	Infantil	Precoce	Tardia	p [£]	
N(%)	14	7	4		8	27	6		
Diarreia	11 (78,6)	7 (100)	2 (50)	0,134	6 (75)	25(92,6)	3 (60)	0,117	54 (81)
Dor abdominal	4 (28,6)	6 (85,7)	3 (75)	0,029	3 (37,5)	18 (66,7)	4 (80)	0,225	39 (59)
Hematoquezia	6 (42,9)	5 (71,4)	1 (25)	0,281	6 (75)	17 (63)	2 (40)	0,446	38 (58)
Comprometimento pondero-estatural	8 (57,1)	4 (57,1)	4 (100)	0,136	3 (37,5)	12 (44,4)	3 (60)	0,726	31 (47)
Febre	5 (35,7)	3 (42,9)	2 (50)	0,862	3 (37,5)	5 (18,5)	3 (60)	0,126	18 (28)
Comprometimento perianal	11(78,6)	1 (14,3)	3 (75)	0,014	-	-	-		9 (14)

Discussão

Os pacientes estudados foram recrutados de um único centro de referência para o atendimento de DII em crianças e adolescentes.

Nos 66 pacientes avaliados, os casos de RU foram vistos com mais frequência. Essa predominância de pacientes com RU é compatível com o descrito por outros autores². Os nossos dados são semelhantes aos dados de outra casuística brasileira, relatada por LIMA et al., cujos pacientes também foram provenientes de um único centro de referência localizado no Nordeste do Brasil. Esses autores descreveram 30 pacientes com DII, sendo que 60% tinham RU⁶, assim como foi observado em nosso estudo. Nem todos os artigos são concordantes quanto à predominância da RU na faixa etária pediátrica. Em 2016, Zhou e Huang descreveram 41 casos de DC em um grupo de 49 crianças. Os próprios autores justificaram esses achados devido às diferenças regionais e ao tamanho da amostra, reafirmando a importância do levantamento de casos de DII nas diferentes regiões do mundo⁷.

No nosso estudo, o predomínio de pacientes oriundos do interior do estado de Pernambuco (59%) reflete o perfil do nosso serviço. O hospital do estudo, o IMIP, assim como o seu serviço de gastroenterologia pediátrica são referências para pacientes encaminhados com quadros mais graves, bem como pacientes com doenças de curso crônico das diferentes regiões do estado. Todavia, esse dado difere do que classicamente é sabido sobre as características geográficas da DII. Sabe-se que a DII é predominante em populações de centros urbanos e mais frequente em países desenvolvidos², diminuindo a sua frequência em países em desenvolvimento, em zonas rurais e comportando-se com o chamado gradiente norte-sul entre os hemisférios e até entre os continentes. Mas, a partir da análise de uma única casuística, não é possível se especular o comportamento da doença em termos de sua distribuição geográfica e extrapolar essas informações. Em vez disso, pode-se utilizar esse dado para reconhecer a

presença da DII em todo o estado, mesmo em áreas rurais, fugindo do protótipo da associação da DII com regiões mais desenvolvidas. Esse reconhecimento gera mais atenção para o diagnóstico e conduta adequada.

Outra diferença ilustra o viés de seleção desse grupo, a frequência de pacientes com apresentações clínicas graves: início da doença antes dos 2 anos de idade (DII infantil) e a proporção de casos complicados com fístulas, estenoses e doença perianal, chegando a 50% dos casos de DC Infantil e Tardia. Novamente, a condição de serviço de referência favorece a triagem de doença mais complicada e mais precoce na busca por atendimento especializado⁹.

A DII ainda é uma doença pouco conhecida na faixa etária pediátrica e, com frequência, é confundida com quadros de enteroinfecções, o que contribui para retardar o seu diagnóstico (LOUIS, 2015). Em uma revisão sobre o diagnóstico e o diagnóstico diferencial da DII em crianças feita em 2016, Palle; Prasad e Kugathasan ressaltam a importância do diagnóstico diferencial da DII em crianças com as colites infecciosas por *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, Citomegalovírus, *Clostridium difficile*, entre outros. O que é justificável dada a grande frequência das colites infecciosas principalmente nas populações menos favorecidas e pelo quadro clínico muito parecido com a fase inicial de muitos casos de DII, o que seria compatível com a nossa região¹⁰. A revisão de Palle, Prasad e Kugathasan, em 2016, também resalta a importância de avarar o diagnóstico de DII na faixa etária pediátrica, mesmo sendo menos frequente. O curso agressivo, complicações e sequelas que são inerentes à DII em crianças exigem diagnóstico precoce para que se iniciem rapidamente intervenções que possam minimizar as repercussões da doença sobre o processo de crescimento e desenvolvimento¹¹. O diagnóstico diferencial com imunodeficiências primárias¹², enterocolites associadas à doença de Hirschsprung, colites

alérgicas, vasculites e colites microscópicas também precisa ser realizado e frequentemente exige o parecer de outros especialistas^{1,11}.

Esses pacientes enfrentam a dificuldade do diagnóstico antes de chegar ao serviço especializado. No nosso estudo, encontramos diferença de até 54 meses na mediana da idade do início dos sintomas e a idade do diagnóstico nos pacientes com DC Precoce. Os pacientes com quadros de DC Infantil, nos quais houve 71,4% de casos com doença complicada, tiveram redução entre a idade de início dos sintomas e o diagnóstico. Esses pacientes também tiveram início dos sintomas muito cedo, sendo a mediana para DC Infantil de 5,82 meses e de RU infantil de 9,5 meses, ou seja, no primeiro ano de vida. A DII Infantil, por ser grave e de início muito precoce, muitas vezes em pacientes com menos de um ano de vida, tem seu diagnóstico mais precoce¹³.

Ressaltamos ainda a frequência alta de pacientes classificados no subgrupo infantil. A DC Infantil correspondeu a 56% (14/25) dos casos de DC do estudo, sendo que a RU Infantil correspondeu a 19,5% (8/41) do total de casos de RU. Begue et al., ao estudar crianças com DII com início antes dos 5 anos de idade, relata 47% de casos de DC e 36% de casos de RU¹⁴. Em contradição ao encontrado no nosso estudo, autores como Benchimol et al. encontraram uma frequência maior de RU em crianças menores de 5 anos ao analisar os casos de DII em crianças no período de 1994-2009 em Ontário, no Canadá¹⁵. Ao avaliar essas diferenças, alguns dados do nosso estudo devem ser enfatizados, como a idade desse subgrupo infantil e gravidade apresentada já no início da doença. Contudo, nenhum desses estudos consideraram a idade limite de 2 anos, como foi feito na nossa análise⁸ com características tão peculiares.

Os pacientes com DII com início antes dos 6 anos de idade, em particular antes de 2 anos de idade, apresentam com maior frequência associação com imunodeficiências¹². Em alguns casos, acredita-se que a herança seja monogênica e a doença se apresente com fenótipo

semelhante à DII (DII-símile), porém mais agressiva e muitas vezes caracterizada por pancolite com formação de fístulas, doença perianal e pouca resposta ao tratamento convencional para DII¹².

Logo, essas crianças com curso mais agressivo de doença foram mais investigadas, sendo observado que muitas tinham associações não só com alterações na via de sinalização da IL10, como apresentavam outros defeitos genéticos. Especula-se que esses defeitos possam estar associados aos quadros clínicos mais agressivos da DII^{9,12}.

Quanto ao sexo, no nosso estudo foi encontrada uma predominância do sexo masculino tanto nos pacientes com DC quanto nos pacientes com RU. Essa distribuição difere entre os estudos realizados com crianças e adultos, como é relatado na revisão de Sauer e Kugathasan que faz o contraponto entre esses estudos¹⁶. Herzog et al. encontraram em crianças suíças menores de 10 anos o predomínio de meninos na DC e predomínio de meninas na RU¹⁷. Hildebrand et al., ao estudar crianças suecas no período de 12 anos, verificaram uma incidência aumentada de meninos com DC comparada a uma taxa de incidência semelhante entre os sexos nas crianças com RU¹⁸. Tais estudos apresentam dados diferentes e não mostram um padrão de distribuição da DII entre os sexos na população pediátrica.

A DII complicada esteve presente em todas as faixas etárias e ambos sexos no nosso estudo. Contudo, o comprometimento perianal esteve presente em uma proporção importante dos pacientes com DC subgrupo Infantil e Tardio, com 78,6% e 75% dos casos, respectivamente. Nesses dois grupos, a mediana de tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico foi mais curta em relação ao subgrupo Precoce. A doença perianal é definida como inflamação perto ou no ânus, caracterizando-se pela presença de *tags*, fissuras, fístulas, abscessos ou estenoses com sintomas de dor, prurido, sangramento, drenagem purulenta e incontinência fecal¹⁹. Adler et al., ao avaliar 7.076 crianças com DC, encontraram 1.399 casos

(21%) de doença perianal em crianças dos Estados Unidos²⁰. Assa et al. encontraram 24% de casos de doença perianal em 234 crianças com DII em um estudo multicêntrico envolvendo crianças dos Estados Unidos, Israel e da Europa²¹. A doença perianal mostra-se um dado importante na avaliação da possibilidade da DII em crianças do subgrupo Infantil, idade na qual a quantidade de diagnósticos diferenciais é grande o que dificulta o diagnóstico de DII.

A diarreia foi o sintoma mais frequente nos dois grupos de DC e RU (Precoce e Tardio), o que era esperado já que a diarreia constitui um sintoma clássico de ambas as formas da DII¹. Porém nos subgrupos de DII Tardia, tanto de DC quanto de RU, a dor abdominal e o comprometimento estatural superaram a diarreia como sintomas mais frequentes. A dor abdominal e o comprometimento estatural são sintomas relevantes e frequentes em ambas as formas da DII¹. Dada essa relevância, a primeira é usada nos dois escores de avaliação de atividade inflamatória utilizados na pediatria (PUCAI e PCDAI) como sintoma indicativo de presença de atividade inflamatória^{22,23}. O comprometimento estatural por sua vez não está presente no PUCAI devido à sua falta de significância durante a construção deste escore. Contudo, o comprometimento estatural é pontuado no PCDAI, assim como está presente na Classificação de Paris para crianças com DC⁸.

O conhecimento sobre o perfil dos pacientes acompanhados reflete na qualidade de atendimento destes pacientes. Ainda, a partir destas informações pode-se identificar problemas a serem investigados em forma de novas pesquisas assim como promover ações para a melhor assistência desta população de pacientes.

Referências

1. Levine A, Koletzko S, Turner D, Escher JC, Cucchiara S et al. The ESPGHAN revised Porto Criteria for the diagnosis of inflammatory bowel disease in children and adolescents. *J Pediatr Gastro Nutr.* 2014;58: 795–806.
2. Molodecky, NA; Soon, SY; Rabi, DM; Ghali, WA; Ferris, M; Chernoff, G et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time based, on systematic review. *Gastroenterology.* 2012;142: 46-54.
3. Cheon, J. Genetics of inflammatory bowel diseases: a comparison between Western and Eastern perspectives. *J Gastroenterol Hepatol.* 2013;28(2):220-6.
4. Malik, TA. Inflammatory bowel disease: historical perspective, epidemiology and risk factors. *Surg Clin North Am.* 2015; 95 (6): 1105-22.
5. Gasparetto M.; Guaruso G. Highlights in IBD epidemiology and its natural history in the paediatric age. *Gastroenterol Res Pract,* 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/829040>. Acesso em janeiro, 2017.
6. Lima, MM.; Silva, LR.; França, RCP, Santana, GO, Ribeiro, IT. Perfil de pacientes pediátricos com doença inflamatória intestinal atendidos em ambulatório de referência na cidade de Salvador. *Rev Cienc Med Bio.* 2013;12(3):337-43.
7. Zhou, Y.; Huang, Y. Inflammatory bowel disease in Chinese children: A retrospective analysis of 49 cases. *Exp Ther Med.* 2016 ;12: 3363-8.
8. Levine, A; Griffiths, A; Markowitz, J; Wilson, DC; Turner, D; Russel, RK et al. Pediatric modification of the Montreal classification for inflammatory bowel disease: the Paris classification. *Inflam Bow Dis.* 2011;17 (6):1314-21.

9. Bianco A. M.; Girardelli M.; Tommasini A. Genetics of inflammatory bowel disease from multifactorial to monogenic forms. *World J Gastroenterol.* 2015;21(43):12296-12310.
10. Lins, M.G.M.; Motta, M.E.F.A.; Silva, G.A.P. Fatores de risco para diarreia persistente em lactentes. *Arq Gastroenterol.* 2003;40(4): 239-46.
11. Palle Sk; Prasad M; Kugathasan S. Approach to a child with colitis. *Indian Journal of Pediatrics.*2016; 83(12):1444-1451.
12. Uhlig HH; Schwerd T; Koletzko S; Shah, N; Kammermeier, J; Elkadri, A et al. The diagnostic approach to monogenic very early onset inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2014; 147:990-1007.
13. Turner, D; Muise, M. Editorial very early onset IBD : how very different ‘on average’? *J Crohn’s Colitis*, 2017. In Press. Disponível em: <https://academic.oup.com/ecco-jcc/article/2896749/Very-Early-Onset-IBD-How-Very-Different-on-Average>. Acesso em março, 2017.
14. Begue, B; Verdier, J; Rieux-Laucat, F; Goulet, O; Morali, A, Canioni, D et al. Defective IL10 signaling defining a subgroup of patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2011; 106 (8): 1544-55.
15. Benchimol EL; 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.
16. Sauer CG; Kugathasan S. Pediatric inflammatory bowel disease: highlighting pediatric differences in IBD. *Gastroenterol Clin North Am.* 2009;38: 611-28.
17. Herzog D; Buehr P; Koller R; Rueger. V; Heyland K; Nydegger, A et al. Gender differences in paediatric patients of the Swiss Inflammatory Bowel Disease cohort study. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr.*2014;17(3): 147-54.
18. Hildebrand H; Finkel Y; Grahnquist L; Lindholm, J; Ekbom, A; Askling, J. Changing pattern of paediatric inflammatory bowel disease in northern Stockholm 1990-2001. *Gut.* 2003;2: 1432-4.

19. De Zoeten, EF; Pasternak, BA; Mattei, Kramer P, Robert E Kader, H. Diagnosis and treatment of perianal Crohn disease: NASPGHAN clinical report and consensus statement. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2013; 57(3): 401-12.
20. Adler J; Dong S; Eder, SJ et al. Perianal Crohn's disease in a large multicenter pediatric collaborative. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2017;64(5): e117-24.
21. Assa, A.; Amitai, M.; Greer M. et al. Perianal pediatric Crohn's disease is associated with a distinct phenotype and greater inflammatory burden. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* Nova Iorque, In Press. Disponível em http://journals.lww.com/jpgn/Abstract/publishahead/Perianal_Pediatric_Crohn_s_Disease_is_Associated.97202.aspx. Acesso em maio de 2017.
22. Hyams JS; Ferry GD; Mandel FS; Gryboski JD, Kibort PM, Kirschner BS et al. Development and validation of a pediatric Crohn's disease activity index. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1991;12(4):439-47.
23. Turner, D; Otley, AR; Mack, D; Lerer, T; Mack, DR; Evans, J et al. Development, validation, and evaluation of a Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index: A prospective multicenter study. *Gastroenterology.* 2007;133: 423–32.

APÊNDICE B

ARTIGO 2

Título: Etiopatogenia da doença inflamatória intestinal na infância e adolescência¹.

Título abreviado: Etiopatogenia da doença inflamatória intestinal

Autores:

Michela C.R. Marmo - Doutoranda em Saúde da Criança e do Adolescente – Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

(michelamarmo@gmail.com)

Kátia G. Brandt – Profa. Adjunta do departamento de Pediatria da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

(katiagaleaobrandt@gmail.com)

Gisélia A.P. Silva – Profa. Titular do departamento de Pediatria da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

(giseliaalves@gmail.com)

- Todas as autoras possuem currículo na plataforma Lattes do CNPq
- Todas as autoras contribuíram com a elaboração do documento: pesquisa bibliográfica e redação do texto
- Conflitos de interesse: nada a declarar
- Instituição vinculada: Universidade Federal de Pernambuco
- Correspondência/contato pré-publicação:

Michela Cynthia da Rocha Marmo

Rua Engenheiro Sampaio, 218, AP 1402, Rosarinho, Recife-PE

CEP 52041-020

Telefone: 81 999454116

Email: michelamarmo@gmail.com

Total de palavras do texto: 4752

Total de palavras do resumo: 127

Sem tabelas ou figuras

¹Artigo formatado de acordo com as normas da revista Jornal de Pediatria (Rio de Janeiro) e submetido à esta revista dia 06/06/2017 (Anexo D)

RESUMO:

Esta revisão se propõe a descrever os aspectos mais atuais da patogênese e fisiopatologia da inflamação do paciente com doença inflamatória intestinal (DII) de início na infância e adolescência. Os aspectos genéticos, imunológicos e ambientais envolvidos na DII foram descritos, em particular, a ação do NOD2, os genes da autofagia e da IL10 e seus receptores. Os conhecimentos acerca da patogênese e evolução da DII em crianças estão aumentando nos últimos anos. Com o aumento do conhecimento sobre a etiopatogênia, surgem novas medidas terapêuticas e propostas diagnósticas. No entanto, há muitas perguntas sem respostas. A utilização de indicadores moleculares de atividade inflamatória encontra-se nesse universo de especulações e ainda sem uma base empírica robusta que corrobore a sua real contribuição na investigação diagnóstica e condução dos pacientes.

Descritores: Doenças inflamatórias intestinais, genes, crianças

ABSTRACT

This review proposes to describe the most current aspects of the pathogenesis and pathophysiology of inflammation of the patient with inflammatory bowel disease (IBD) of early childhood and adolescence. The genetic, immunological and environmental aspects involved in IBD have been described, in particular, the action of NOD2, autophagy and IL10 genes and their receptors. Knowledge about the pathogenesis and progression of IBD in children has been increasing in recent years. With the increasing knowledge about the etiopathogenesis, new therapeutic measures and diagnostic proposals appear. However, there are many unanswered questions. The use of molecular indicators of inflammatory activity is found in this universe of speculations and yet without a robust empirical basis that corroborates its real contribution in the diagnostic investigation and conduction of the patients.

Descriptors: inflammatory bowel disease, children, adolescents

Introdução

A doença inflamatória intestinal (DII) foi relatada como tal pela primeira vez em 1932 por Crohn, Ginzburg e Oppenheimer no *Journal of American Medical Association*, como uma ileíte terminal¹. Apesar de esta ser considerada por muitos como a primeira descrição da doença, há relatos de manifestações clínicas similares desde o ano 850 d.C., como as do Rei Alfred de Wessex, que sofria de dor ao se alimentar associada a fístulas perianais, e os relatos do médico patologista italiano Giovanni Battista Morgagni, de 1761 em Pádua, que descreveu um caso de ileíte regional. Em 1960, Lockhart-Mummery e Morson relataram que a doença de Crohn (assim conhecida em homenagem ao primeiro autor que a descreveu) também poderia cursar com acometimento do cólon, assim como já descrito na retocolite ulcerativa (o que já era defendido por Crohn), descrevendo de forma detalhada a histologia e clínica do processo inflamatório de ambas as doenças^{2,3}.

Hoje se sabe que a DII consiste em um grupo de doenças, com evolução crônica e períodos de agudização relacionados à ativação de um processo inflamatório no trato gastrointestinal. Os avanços dos métodos diagnósticos permitiram uma melhor compreensão de diversos aspectos da DII, tais como: seu caráter sistêmico e envolvimento do sistema imune do trato gastrointestinal, características das manifestações extraintestinais, associação com câncer de intestino, vulnerabilidade genética, descrição de síndromes monogênicas similares a ela e, finalmente, o papel da microbiota intestinal na sua fisiopatogenia⁴. No entanto, a complexidade e a diversidade das manifestações clínicas da DII deixam muitas perguntas sem respostas, o que motiva especialistas de diferentes áreas – gastroenterologia, genética, patologia, entre outras – a continuar estudando a DII.

A explicação mais aceita hoje no tocante à patogenia da DII é que a inflamação na mucosa intestinal é resultante de uma desordem na modulação do sistema imunológico

intestinal envolvendo polimorfismos genéticos e a microbiota. Essa desregulação geraria o processo inflamatório característico dos períodos de exacerbação da doença, levando aos sintomas e alterações clínicas, laboratoriais e endoscópicas que definem a DII⁵. No entanto, os mecanismos patogênicos não são de um todo conhecidos e ainda não há modelos que expliquem de forma satisfatória as várias faces da doença.

Esta revisão tem como objetivo descrever os aspectos mais atuais da sua patogênese, fisiopatologia da inflamação, buscando entender o paciente complexo e único que é o paciente com DII.

A doença inflamatória intestinal: aspectos gerais

A doença inflamatória intestinal engloba três apresentações fenotípicas: a doença de Crohn, a retocolite ulcerativa e a colite indeterminada. Define-se a doença de Crohn (DC) como uma inflamação granulomatosa que pode acometer todo o trato gastrointestinal de forma descontínua, estendendo-se da mucosa até às serosas (transmural); e a retocolite ulcerativa (RU), como uma inflamação não-granulomatosa restrita ao cólon, de caráter contínuo e que é limitada à mucosa. A denominação de colite indeterminada (CI) é reservada àqueles casos em que, mesmo após todo o processo de investigação diagnóstica, o paciente não preenche nos critérios diagnósticos de DC ou de RU^{5,6}.

A incidência em adultos é estimada em torno de 200 casos de DC e 240 casos de RU para 100 mil habitantes em países desenvolvidos, sendo observado um aumento da incidência de DC nos últimos anos⁷. Embora os estudos epidemiológicos ainda sugiram uma maior ocorrência da DII em países ocidentais, os dados asiáticos mostram que a doença está aumentando rapidamente nessa região⁸. Atualmente, a maior incidência da DII ocorre nos

países do hemisfério norte, como os Estados Unidos, Canadá e países europeus⁹, e com um pico em torno da segunda década de vida e outro após os 60 anos. Chama atenção que aproximadamente 25% dos casos têm início na faixa etária pediátrica¹⁰.

Hoje já não se discute a contribuição da genética para a DII, considerando que há uma boa base empírica que aponta a sua participação na gênese da doença a partir da constatação de uma maior incidência da DII em populações caucasianas, da observação de um risco aumentado em certos grupos étnicos (por exemplo, judeus ashkenazi), da forte associação familiar entre os pacientes europeus e da concordância em gêmeos monozigóticos⁹. Há estudos mostrando diferenças no comportamento clínico da doença provavelmente associado a polimorfismos genéticos, o que fortalece o argumento da contribuição genética na etiopatogenia da DII^{8,11}.

No entanto, apesar do grande número de estudos sobre genes associados à DII, ainda é necessário um melhor entendimento sobre o papel da genética na sua origem¹⁴. A grande quantidade de polimorfismos associados à DII e o caráter poligênico da doença na maioria dos casos dificultam essa investigação¹³. Por outro lado, recentemente, tem chamado atenção dos clínicos um grupo de pacientes com início precoce ou muito precoce da doença e levantada a hipótese de que essa apresentação esteja mais fortemente associada à herança monogênica¹⁶.

O papel do ambiente, em particular o ambiente luminal onde está a microbiota intestinal, é outro aspecto que tem sido bastante estudado em relação à patogênese da DII. O modelo atualmente proposto para explicar a etiopatogenia da DII sugere uma interação complexa entre fatores ambientais luminais e genéticos¹⁵.

Sabe-se que, em condições normais, o trato gastrointestinal é continuamente exposto a uma variedade de antígenos, incluindo bactérias entéricas e alimentos, que levaria a uma “inflamação fisiológica” com a supressão de respostas imunológicas excessivas a antígenos estranhos. Na DII, a homeostase é quebrada como consequência da alteração de elementos da

barreira intestinal, levando à invasão bacteriana e à inflamação¹⁶. Como Schirbel e Fiocchi afirmaram em revisão da literatura, a resposta imunológica é o braço efetor que mede a inflamação e compreender sua função e seu desequilíbrio no trato gastrointestinal na DC e na RU é fundamental para desvendar os complexos mecanismos da inflamação intestinal crônica¹⁵.

Os polimorfismos genéticos relacionados à DII gerariam “defeitos” em diferentes pontos do processo, como, por exemplo, na função de barreira intestinal contra bactérias intestinais comensais e/ou patogênicas. A perda da função de barreira permitiria a invasão de elementos da microbiota intestinal, tal como acontece no modelo que explica como a invasão bacteriana desencadeia o processo inflamatório a partir da ativação de citocinas pró-inflamatórias na tentativa de bloquear o agente invasor⁴.

Em suma, a origem do processo inflamatório na DII resulta da interação de fatores genéticos, bacterianos e imunológicos. Os polimorfismos genéticos criam condições que levam à desregulação imunológica e à ativação de cascatas inflamatórias que resultará em agressão à mucosa intestinal. Portanto, nesse contexto, a interação entre a microbiota e a mucosa intestinal gera uma resposta inflamatória anormal, que seria o ponto de partida da DII¹⁷.

Contudo, o conhecimento acerca dos polimorfismos genéticos envolvidos na DII, assim como de que forma os acontecimentos intra e extrauterinos configuram a expressão gênica nessa entidade, ainda é incompleto. Fiocchi, em 2012, afirmou que o paradigma determinístico (genótipo/fenótipo) na DII não é mais aceito¹⁸. A interação genes e meio ambiente, mais especificamente, o ambiente luminal, se daria de uma forma bem mais complexa e não seria igual para todos os indivíduos, o que justificaria os diferentes fenótipos da DII^{19,20}. O desconhecimento é agravado pela complexidade das interações: gene-gene, gene-ambiente e gene-microbiota. O produto dessas interações resultaria na heterogeneidade clínica e laboratorial característica da DII¹⁴.

A inflamação na DII

É esperado que o organismo defenda-se de qualquer dano tecidual desencadeando uma resposta inflamatória. A inflamação envolve aspectos vasculares, celulares e moleculares. Classicamente, manifesta-se por rubor, calor, edema, dor e prejuízo funcional. Na inflamação aguda, predomina a resposta imunológica inata e, na inflamação crônica, o dano é persistente, mais complexo e vai se modificando progressivamente.

Aspectos gerais da resposta inata e adaptativa da mucosa intestinal

A partir de um modelo aplicado a agressão por um agente infeccioso, pode-se compreender algumas características da resposta inata e adaptativa da mucosa intestinal⁴. Na resposta inata, principalmente no processo agudo, há uma participação importante de células efetoras – macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células *natural killer*. As barreiras anatômicas e a integridade do muco têm um papel importante, merecendo destaque a fagocitose, a liberação de mediadores inflamatórios, a ativação de proteínas do sistema complemento, bem como a síntese de proteínas da fase aguda, citocinas e quimiocinas. O mecanismo é ativado por moléculas comumente encontradas na superfície de microorganismos, denominadas padrões moleculares associados a patógenos (*PAMPs*), que interagem com receptores presentes nas membranas celulares⁴. A interação dessas moléculas com os receptores de reconhecimento padrão (RRP) ativa a resposta imunológica inata²⁰. É uma interação análoga à reação antígeno-anticorpo, no entanto, não há resposta adaptativa e não confere imunidade em longo prazo.

O papel central dos RRP é facilitar a opsonização, ativar o sistema complemento (SC) e a fagocitose. Destacam-se pela capacidade de ligação ao patógeno, iniciando a resposta

inflamatória, e estão localizados nas células dendríticas, neutrófilos e macrófagos⁴. O sistema complemento age mediante a ação de substâncias solúveis, como as proteínas do SC e a proteína C reativa (PCR), após a ligação aos RRP. Posteriormente, o patógeno é internalizado em vesículas chamadas fagossomos. Estas se fundem ao lisossomo, que libera seu conteúdo, digerindo e eliminando o patógeno.

A complexa composição do sistema imunológico inato (SII) – com suas barreiras anatômicas, RRP e múltiplos tipos de células – permite uma resposta rápida e eficaz contra o patógeno invasor. Essa resposta leva a uma “linha de produção” de citocinas que funciona como uma ponte para ativação das células T e ativação do sistema imune adaptativo (SAI)⁴.

Em contraste com o SII, o SIA desenvolve respostas altamente específicas ao antígeno. O processo de apresentação do antígeno pela célula dendrítica, pelo macrófago e pelas células B induz o desenvolvimento e a maturação de células imunológicas em lugares indutores como o tecido linfóide do mesentério e o GALT – tecido linfóide associado ao intestino (*gut associated lymphoid tissue*). O linfócito Th0 é ativado e se diferencia em Th1 (responsável pelo *clearance* intracelular de patógenos), Th2 (responsável pela resposta alérgica e a parasitas) ou Th17 (responsável pela resposta a bactérias e fungos)⁴.

O processo inflamatório na DII

O epitélio intestinal é a maior interface entre o meio interno do organismo e o meio exterior; reagindo a diversos estímulos não nocivos com um “estado de inflamação controlada”. Essa resposta inflamatória que não está associada à doença funciona como um mecanismo fisiológico. A “inflamação controlada” tem como objetivo defender o hospedeiro, reparar o tecido e restabelecer a homeostase²⁰. O intestino, por ser um órgão que está em constante

comunicação com a sua microbiota e com o meio externo, necessita desse processo de “inflamação controlada” e reparação permanente. Em pacientes com DII, a inflamação é em graus e duração excessivos e ocorrem lesões teciduais que se manifestam por dano e morte celular, destruição da arquitetura tecidual e perda da função, levando a fibrose, metaplasia, autoimunidade e câncer²¹.

A mucosa intestinal está constantemente exposta a antígenos microbianos e antígenos oriundos da dieta. Certo grau de permeabilidade é necessário para que o intestino exerça sua função e mecanismos de autorregulação asseguram a homeostasia. Quando algum fator leva à perda desse equilíbrio, é gerada uma condição que propicia a inflamação crônica mediada pelo sistema imunológico por meio das suas respostas inatas e adaptativas¹⁹. A doença inflamatória intestinal surge no contexto de grande complexidade onde cada componente – seja associado à mucosa ou ao sistema imunológico intestinal, à microbiota intestinal e/ou ao ambiente – tem um papel importante.

O sistema imunológico inato (SII)

O SII do trato gastrointestinal atua através das suas barreiras anatômicas (barreira epitelial e mucosa), RRP e células. A barreira mucosa é a primeira barreira contra os antígenos microbianos, sua principal função é impedir o contato desses antígenos com o meio interno. O muco faz parte da barreira mucosa, é produzido pelas células caliciformes formando duas camadas – uma externa e uma interna – e é composto de proteínas, carboidratos e lipídeos, sendo o seu principal componente uma glicoproteína, a mucina²¹. A camada externa é mais fluida, tendo mucina, antibacterianos (*antimicrobial peptides* – AMPs) e bactérias comensais. Já a camada interna é mais consistente e aderida ao epitélio, sendo livre de bactérias^{19,20}.

A barreira epitelial também tem funções de digestão, absorção e secreção. As células das criptas do epitélio proliferam e migram para mantê-lo íntegro e repor as células que tenham sofrido lesão ou apoptose, permitindo que a camada epitelial se renove a cada dois a três dias. O epitélio é formado por enterócitos e outras células epiteliais mais especializadas, como as células de Paneth, as células caliciformes e células enteroendócrinas ⁴. As células de Paneth secretam substâncias antibacterianas (lisozimas, α -defensinas e outras glicoproteínas com efeito antibacteriano) e fagocitam bactérias.

Em condições fisiológicas, os AMPs são secretados pelas células de Paneth após o reconhecimento de componentes bacterianos pelos RRP expressos também nas células da barreira epitelial. Os AMPs estão mais concentrados na camada interna de muco contribuindo para a manutenção da sua esterilidade²¹. Os AMPs das células de Paneth são liberados após a estimulação do NOD2 pelos lipolissacarídeos e dipeptídeos muramílicos. Os RRP, como os *toll-like receptors* (TLRs) e o NOD (*nucleotide binding oligomerization domain*) constituem uma grande família e com particular interesse para a DII estão os receptores NOD-like²².

Os TLRs são proteínas transmembrana que reconhecem proteínas moleculares extracelulares associadas a patógenos e também localizadas intracelularmente nas membranas dos endossomos no epitélio intestinal. No intestino existe um estado de tolerância onde os TLRs não estão ativados. Mas a quebra da tolerância leva à ativação e pode contribuir para a inflamação crônica, como na DII. Alguns estudos sugerem que genes dos TLRs 2 e 4, especificamente, estão ativados em pacientes com DII⁴.

Outro complexo de múltiplas moléculas, denominado inflamassoma, participa do desencadeamento da resposta imunológica inata. É ativado em resposta a estímulos endógenos e microbianos para evitar a quebra da homeostase celular, protegendo a integridade da célula e controlando a interação entre o hospedeiro e microbiota. Quando ativado, induz a produção de

interleucinas pró-inflamatórias (IL1 e IL8) que promovem o recrutamento de fagócitos, angiogênese, reparo epitelial no local da lesão. No intestino, alterações na sua expressão podem levar à perda de proteção contra infecções, disbiose, inflamação e perda no reparo da barreira epitelial⁴.

Outras estruturas na barreira epitelial do intestino estão envolvidas no processo inflamatório e contribuem para a patogênese da DII. Os desmossomos, as “*tight junctions*” e as junções de adesão mantêm a integridade da barreira epitelial em indivíduos saudáveis protegendo contra antígenos indesejáveis. A falha na barreira epitelial por meio da disfunção das suas células ou das estruturas de adesão celular tem sido descrita como possíveis mecanismos patogênicos da DII¹⁹.

Nos últimos anos, diversos polimorfismos genéticos têm sido identificados em pacientes portadores de DII e vários estudos foram realizados com o objetivo de analisar o seu papel na desregulação imunológica que caracteriza essa doença^{23,24}. Mas, acredita-se ser pouco provável que um modelo único explique de forma satisfatória a patogenia da DII^{4,5}. Os polimorfismos do NOD2 e dos genes de autofagias estão entre os mais estudados.

Os NOD like receptor

A “família” NLR (*NOD like receptors*) é representada pelos NOD1 (*nucleotide binding oligomerization domain containing 1*) e NOD2 (*nucleotide binding oligomerization domain containing 2*). O NOD2 foi o primeiro gene associado à DII por Hugot (2001). O NOD2 é considerado um RRP, estando presente nos monócitos do sangue periférico e pelos enterócitos. Está localizado no cromossomo 1 e codifica uma proteína envolvida no reconhecimento do componente do muramil-dipeptídeo da parede celular peptidoglicana da bactéria que ativa a via

do fator NF- κ B (*kappa light chain enhancer of activated B cells*). A “família” do NOD ativa as vias de sinalização que promovem uma cascata de reações resultando na ativação do fator NF- κ B, estimulando a transcrição de genes responsáveis pela produção de mediadores pró-inflamatórios, assim como a interação e ativação do sistema imunológico adaptativo²⁵. Logo, a ação do NOD resulta na efetiva resposta contra antígenos agressores e na eliminação desses.

Desde a sua primeira descrição, o NOD2 é o gene apontado com maior frequência nos estudos que analisam genes associados à DC, em homozigose ou mesmo em heterozigose, sendo descritos três polimorfismos maiores associados à DC em caucasianos: o Arg702Trp, Gly908Arg e Leu1007fsinsC²⁶.

Defeitos na produção de AMPs, relacionados ao NOD2 e que repercutem na adesão celular, permitem o contato e a invasão de antígenos agressores, gerando o processo inflamatório crônico presente na DII²⁵. Polimorfismos do NOD2, associados a defeitos na expressão das defensinas, e os genes associados com a adesão celular (HNF4A, CDH1, LAMB1 e GNA12) têm sido descritos em pacientes com DC e/ou a RU.

Genes associados à autofagia

A autofagia é um processo intracelular responsável pela degradação de proteínas e organelas produzidas em excesso, danificadas ou velhas e que, se não forem removidas, comprometem a homeostase. A autofagia está sempre ativa em um nível basal na maioria das células e sua atividade é modulada pelo estresse, hipóxia, infecção e desnutrição. Todo o processo de autofagia é coordenado pelo complexo de proteínas ATG (*autophagy related protein*).

Um dos primeiros genes de autofagia associado à DC foi o ATG16L1. Os polimorfismos do gene ATG16L1A resultam na perda da proteína com o mesmo nome e consequentemente no aumento das interleucinas pró-inflamatórias IL1 β e IL18. A proteína ATG16L1 também age como modulador da atividade do NOD2 e, quando ela está ausente, a sua ação pró-inflamatória aumenta²⁷. Tem ação importante como apresentadora de antígeno e ativa o SIA. Outros polimorfismos de genes associados à autofagia podem estar envolvidos na patogenia da inflamação da DII, no entanto ainda carecem de estudos²⁴.

O sistema imunológico adaptativo

O SII se comunica com o SIA no intestino por meio de “pontes” representadas pelas células linfoides inatas, as células T não variadas associadas à mucosa (MAIT – *mucosal-associated invariant T cells*) e as células apresentadoras de antígeno⁴. As células linfoides inatas estão presentes na mucosa dos tecidos e ajudam a manter a integridade da barreira epitelial. As células MAIT são células que diferem das células T; são abundantes no intestino, onde se localizam preferencialmente. Sua função ainda não está totalmente esclarecida, especula-se que funcionam como a ponte entre o SII e o SIA na defesa contra as bactérias. As células apresentadoras de antígeno atuam na conexão do SII e do SIA, ativando e modulando a resposta das células T sendo cruciais para manter a homeostase⁴.

A célula Th17 tem também a sua produção induzida pelo TGF β , IL6 e IL23. Esta célula produz IL17A, IL17F, IL21 e IL22. As células Th17 são importantes na inflamação da DII, pois estudos mostram aumento da produção dessas células nessa doença¹⁹.

As células Treg, também estimuladas pelo TGF β , são responsáveis por monitorar a resposta imunológica, prevenindo a sua ativação excessiva e potencialmente agressiva. Atualmente postula-se

que as células Th17 e Treg compartilham de vias em comum, levando às ligações funcionais entre essas duas células¹⁹.

Interação SII-SIA: o papel da IgA

Os linfócitos B também são células apresentadoras de antígenos, além de agirem na produção de anticorpos e geração de citocinas. Em particular as células B intestinais diferenciam-se em plasmócitos e secretam IgA. Sabe-se que a IgA é o anticorpo mais abundante no corpo humano e é de vital importância para o trato gastrointestinal, sendo produzida nas placas de Peyer com o estímulo do TGF- β que é o gatilho para a diferenciação das células B em plasmócitos. A IgA, após interação com o receptor de imunoglobulina na superfície lateral do epitélio, é transportada para o lúmen intestinal como IgA secretória. Sua ação no lúmen é evitar o acesso da bactéria e toxinas ao hospedeiro. A IgA age no muco reduzindo a expressão do epítipo da bactéria e de antígenos alimentares, diminuindo a colonização de bactérias no intestino. Também tem a função de apresentar a bactéria comensal de forma seletiva para células dendríticas via um complexo formado por bactéria-IgA que atravessa a mucosa ao interagir com um receptor especializado. Todas essas funções fazem com que as células B e a IgA estejam presentes nesta complexa interação entre o SII e o SAI²⁸.

Interação SII e SIA: o papel das citocinas

A interleucina (IL) desempenha um papel importante na interação do sistema imunológico inato e adaptativo, sendo o principal mediador da diferenciação da célula T

induzindo ou não uma resposta inflamatória. Existem muitas citocinas e o efeito resultante de suas ações é complexo. De forma simplista, as citocinas, segundo seus tipos de ação, são classificadas em pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. A interação das citocinas IFN γ /IL12 e IL23/IL17 leva à liberação de um conjunto complexo de citocinas pró-inflamatórias (IL18, IL2, IL1, IL21, IL22). As células Th1 e Th2 produzem IL6 e TNF α . A ativação dessa rede de citocinas leva ao recrutamento de mais células efectoras e o início da inflamação da mucosa, que pode se tornar crônica devido à falta de regulação da resposta imunológica²⁸.

O SIA está fortemente envolvido no processo inflamatório crônico do intestino na DII. As células Th1 induzem a produção de IL12, IFN γ e TNF α – respostas anormais dessas células induzidas pelos níveis aumentados de IL18 e IL12 são associadas a DC. O IFN γ induz a morte do enterócito e estimula a liberação de TNF α a partir da ativação de macrófagos¹⁹. A resposta das células Th2 é induzida pela IL13, produzindo IL4, IL5 e IL13 e são associadas à patogênese da RU¹⁹.

O fator de necrose tumoral alfa (TNF α) é uma citocina pró-inflamatória sintetizada por células mononucleares. A síntese de TNF α é ativada por receptores *toll-like* (TLR-4) existentes nas membranas celulares. A ativação dos TLR-4 induz a ativação de fator nuclear κ B (NF- κ B) e proteínas quinases-mitógenas, causando aumento da proliferação celular e diferenciação de macrófagos e a indução de expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF α , IL6 e IL12. A ativação dessas vias é importante para homeostase, no entanto, quando desreguladas, induzem proliferação celular, diferenciação e liberação de várias citocinas pró-inflamatórias, incluindo o próprio TNF α . Ainda, a sinalização do TNF α induz a ativação da caspase-8 e apoptose de células intestinais epiteliais, induzindo mudanças na expressão epitelial das proteínas das *tight junctions* entre pacientes com DC, além de diminuir a função da barreira mucosa dos pacientes com DII, exacerbando a inflamação. O TNF α é a principal citocina que

induz a diferenciação de células estromais em miofibroblastos e a produção de metaloproteinases que degradam o tecido¹⁹.

A IL6 é uma citocina multifuncional envolvida na regulação de respostas imunes, na reação de fase aguda e hematopoese. O pleiotropismo é uma de suas principais características e em parte explica porque está expressa em várias células. Em resposta a infecções ou lesões teciduais por traumas, a IL6 é prontamente sintetizada e ativa a resposta imunológica, induzindo a diferenciação de células B ativadas em células plasmáticas produtoras de imunoglobulinas. A IL6 estimula os hepatócitos a produzir proteínas de fase aguda, tais como a PCR, serum amiloide A, fibrinogênio, hepcidina e α 1-antiquimotripsina, reduzindo a produção de fibronectina, albumina e transferrina. A PCR é um marcador de inflamação e sua síntese é principalmente regulada pela IL6²⁹.

Contudo, a função da IL10 no trato gastrointestinal ainda não está totalmente elucidada. Ainda há questões não respondidas em relação ao seu papel na imunoregulação). Na última década, aumentou o número de publicações que descrevem mutações e alterações no gene e na expressão da IL10 no sistema imunológico gastrointestinal. A participação da IL10 na patogênese da DII, em especial nos casos de início precoce, ganhou força nos últimos anos, apesar dos relatos de mutações homozigóticas ainda serem raros³⁰.

As mutações da IL10 resultam em uma sinalização defeituosa. O processo normal começa com a ligação do homodímero da IL10 ao seu receptor (IL10R). O IL10R consiste em um complexo tetramérico composto por duas moléculas de cadeias α (IL10RA) e duas moléculas de cadeias β (IL10RB). Essa ligação ativa a Janus Kinase1 (JAK1) e a tirosina kinase2 (Tyk2) que sofrem autofosforilação e subsequente ativação do IL10R1, recrutando, assim, o transdutor e ativador de sinal de transcrição3 (STAT3). A ativação do STAT3 é contraditória na patogênese da DII. A sua relação com a IL10 leva a crer na sua ação anti-

inflamatória, no entanto, o STAT3 pode contribuir para a inflamação em outras células. Os polimorfismos genéticos na IL10, no IL10R e no STAT3 são relacionados à patogenia da DII, principalmente nos casos mais graves de colite de início precoce²⁹.

Repercussões locais e sistêmicas da inflamação

O paciente portador de DII apresenta alterações inflamatórias características, apesar de não patognomônicas. Segundo os critérios de Porto, dados da história clínica, do exame físico, dos exames laboratoriais, dos exames de imagem e da avaliação histológica são necessários para o diagnóstico e acompanhamento desses pacientes⁶. Na RU, a característica mais marcante é a inflamação crônica contínua sem a presença de granuloma e, na DC, é a presença de inflamação crônica focal com ou sem granulomas⁶. As alterações inflamatórias estão relacionadas aos períodos de atividade da DII¹⁰.

As alterações no SII e no SAI podem levar a alterações no padrão de infiltrado celular e citocinas na mucosa. A resposta inflamatória ativada por estes defeitos produz as lesões de mucosa típicas da DII concentrando células e citocinas inflamatórias. A lesão da mucosa mostra esse arsenal de células e citocinas em grande parte localizado na lâmina própria. Na DII ativa, há um grande infiltrado na lâmina própria de células do sistema imunológico inato, como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e células natural killer e do sistema imune adaptativo, como células B e T. A ativação dessas células leva ao aumento na mucosa de TNF α , IL- 1 β , interferon- γ e citocinas da via IL23-Th17 na DC e RU¹⁵.

Os macrófagos são células importantes nesse processo, já que no intestino normal são condicionados a expressar um fenótipo não inflamatório com a inibição dos receptores de imunidade inata e contenção da produção de citocinas pró-inflamatórias. No paciente com DII,

os macrófagos apresentam um fenótipo ativado e, junto aos macrófagos recrutados do sangue periférico, expressam o marcador CD14, priorizando a produção de várias citocinas pró-inflamatórias, como a IL1 α , IL1 β e o TNF α . Nos pacientes com DC, os macrófagos CD14 são aumentados em número e produzem mais IL23 e TNF α , contribuindo para a produção de INF γ pelas células T locais quando comparados com pacientes com RU ou sem DII¹⁵.

Por sua vez, as células dendríticas são muito envolvidas na iniciação e regulação da resposta imunológica inata local por serem células apresentadoras de antígenos. Sabe-se que na DC as células dendríticas são ativadas e a expressão dos seus receptores microbianos está aumentada, produzindo citocinas pró-inflamatórias como a IL12 e a IL6. Seu envolvimento com a DII ainda não está muito esclarecido, já que junto aos macrófagos, são células de difícil estudo, além do que as células dendríticas estão em pequena quantidade na mucosa intestinal e têm fenótipos variados¹⁵.

O acúmulo de neutrófilos na mucosa do intestino é uma alteração comum na DII vista no estudo histopatológico e indica atividade inflamatória da doença, sendo relacionado com o SII. Os neutrófilos podem liberar substâncias com capacidade de danificar o tecido e a sua associação com dano tecidual indica atividade inflamatória. O recrutamento e a adesão dessas células são mediados pela ação de citocinas pró-inflamatórias como a IL1 e o TNF α , levando à manutenção do processo inflamatório. Os vasos sanguíneos intestinais também participam no acúmulo de neutrófilos por falha na regulação da entrada dos leucócitos no tecido¹⁵.

No paciente com DII em atividade, a inflamação pode ser detectada em vários níveis e ter diferentes expressões fenotípicas nas manifestações clínicas, nas manifestações laboratoriais, histológicas e moleculares. As evidências inflamatórias nos vários níveis de avaliação do paciente permitem verificar a extensão e a intensidade da doença nos períodos de crises, assim como classificar fenotipicamente cada paciente⁶. A evolução e complicações da

DII tanto adulta quanto pediátrica estão intimamente ligadas ao controle ou não da atividade inflamatória da doença. O ganho estatual, a normalidade dos exames laboratoriais e endoscópicos, assim como a remissão da inflamação histológica levariam ao controle da doença, o que hipoteticamente deixaria o paciente livre de sintomas e complicações⁶.

A necessidade de identificação desses períodos leva à discussão sobre os indicadores de atividade inflamatória e seu valor na prática clínica diária. Os sintomas característicos do paciente em atividade inflamatória, os índices de atividade inflamatória, os biomarcadores laboratoriais e moleculares, a avaliação endoscópica e histológica permitem o diagnóstico de atividade, mas devem ser avaliados com cautela.

Considerações finais

Os conhecimentos acerca da patogênese e evolução da DII em crianças estão aumentando nos últimos anos. Com o aumento do conhecimento sobre a etiopatogênia, surgem novas medidas terapêuticas e propostas diagnósticas. No entanto, há muitas perguntas sem respostas. A utilização de indicadores moleculares de atividade inflamatória encontra-se nesse universo de especulações e ainda sem uma base empírica robusta que corrobore a sua real contribuição na investigação diagnóstica e condução dos pacientes.

A distância entre o conhecimento teórico e o uso na rotina de assistência ainda é grande. Contudo, o uso criterioso dos indicadores validados já existentes e a busca por indicadores mais acurados são grandes passos para o diagnóstico e tratamento das DII.

Referências

1. Crohn, BB.; Ginzburg, L.; Oppenheimer, G.D. Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. *JAMA*. 1932; 99 (16): 1323-9.
2. Campos, FGMC.; Kotze, PG. Burrill Bernard Crohn (1884-1983): o homem por trás da doença. *Arq Bras Cir Dig*. 2013;26(4): 253-5.
3. Lockhart-Mummery HE; Morson BC. Crohn's disease (regional enteritis) of the large intestine and its distinction from ulcerative colitis. *Gut*. 1960; 1: 87.
4. Choy MC.; Visvanathan K; De Cruz P. An overview of the innate and adaptive immune system in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2017;23: 2-13.
5. Sartor RB.; Wu GD. Roles for intestinal bacteria, viruses, and fungi in pathogenesis of inflammatory bowel diseases and therapeutic approaches. *Gastroenterology*. 2017; 152: 327-339.
6. Levine A, Koletzko S, Turner D, Escher JC, Cucchiara S et al. The ESPGHAN revised Porto Criteria for the diagnosis of inflammatory bowel disease in children and adolescents. *J Pediatr Gastro Nutr*. 2014;58: 795–806.
7. Molodecky, NA.; Soon, SY; Rabi, DM. et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time based, on systematic review. *Gastroenterology*. 2012;142: 46-54.
8. CHEON, J. Genetics of inflammatory bowel diseases: a comparison between Western and Eastern perspectives. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28(2):220-6.
9. Malik TA. Inflammatory bowel disease: historical perspective, epidemiology and risk factors. *Surg Clin North Am*. 2015; 95 (6): 1105-22.
10. Gasparetto M; Guaruso G. Highlights in IBD epidemiology and its natural history in the paediatric age. *Gastroenterol Res Pract*, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/829040>. Acesso em janeiro, 2017.
11. Kim, BJ; Song, SM; Kim, KM et al. Characteristics and trends in the incidence of inflammatory bowel disease in Korean children: a single-center experience. *Dig Dis Sci*. 2010; 55: 1989-95.
12. Ng, SC.; Bernstein, CN; Vatn, MH. et al. Geographical variability and environmental risk factors in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2013; 62 (4): 630-49.

13. Venema, WTCU.; Voskuil, MD.; Dijsktra, G et al. The genetic background of inflammatory bowel disease: from correlation to casuality. *J Pathol.* 2017; 241: 146-58.
14. Uhlig HH; Schwerd T; Koletzko S et al. The diagnostic approach to monogenic very early onset inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2014; 147:990-1007.
15. Schirbel, A.; Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: established and evolving considerations on its etiopathogenesis and therapy. *J Dig Dis.* 2010; 11:266-76.
16. Hisamatsu, T; Kanai, T; Mikami, Y et al. Immune aspects of the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Pharmacol Ther.* 2013; 137: 283-97.
17. Mezoff EA; Aly H. The winding road to understanding the neonatal origins of inflammatory gastrointestinal disorders. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2013; 57: 543-49.
18. Fiocchi, C. Genes and 'in-vironment': how will our concepts on the pathophysiology of inflammatory bowel disease develop in the future? *Dig dis.* 2012;30(3):2-11.
19. Geremia, A; Bianchieri, P; Allan, P; Corazza GR; Di Sabatino, A. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmunity Reviews.* 2014; 13(1): 3-10.
20. Abraham, C; Medzhitov, R. Interactions between the host innate immune system and microbes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2011;140 (6): 1729-37.
21. Rieder, F; Fiocchi, C. Mechanisms of tissue remodeling in inflammatory bowel disease. *Dig Dis.* 2013; 31(2):186-93.
22. Abdullah, M; Syam, AF; Simadibrata, M. et al. New insights on the pathomechanisms of inflammatory bowel disease. *J Dig Dis.* 2013; 14:455-62.
23. Begue, B; Verdier, J; Rieux-Laucat, F. et al. Defective IL10 signaling defining a subgroup of patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2011; 106 (8): 1544-55.
24. Bianco AM; Girardelli M; Tommasini A. Genetics of inflammatory bowel disease from multifactorial to monogenic forms. *World J Gastroenterol.* 2015;21(43):12296-12310.
25. Vignal, C; Singer E; Peyrin-Biroulet, L. et al. How NOD2 mutations predispose to Crohn's disease? *Microbes and Infection.* 2007; 9: 658-63.
26. Lacher, M; Helmbrecht, J; Schroepf, S. et al. NOD2 mutations predict the risk for surgery in pediatric-onset Crohn's disease. *J Pediatr Sur.* 2010; 45(8):1591-7.

27. Hooper KM; Barlow PG; Stevens C. et al. Inflammatory bowel disease drugs: a focus on autophagy. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2017; 11 (1):118-127.
28. Fava, F; Danese, S. Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease: friend of foe? *World J Gastroenterol*. 2011;17(5): 557-66.
29. Tanaka T; Kishimoto T. The biology and medical implications of Interleukin-6. *Cancer Immunology Research*. 2014; 2(4):288-294.

APÊNDICE C

Formulário de pesquisa – dados clínicos

Identificação

Grupo: _____ Indentificação _____
 Número formulário: **{form}** ☐ ☐ ☐ Data de atendimento ____/____/____

1. Nome: _____
2. Data de nascimento ____/____/____ idade em meses **{idmeses}** _____
3. Mãe: _____
4. Endereço: _____
5. Sexo **{sexo}** ☐ (1) masculino (2) feminino
6. Telefone (casa) _____ (telefone) _____
7. Informante: _____

Dados sociais

8. Renda total da família (em números de salário)(colocar ao lado o número de salários) : _____ **{rend}**

- (1) < 1 salário
- (2) 1 a 2 salários
- (3) 2 a 3 salários
- (4) 3 a 4 salários
- (5) 4 a 5 salários
- (6) > 5 salários
- (7) Não sabe
- (8) Não se aplica

9. Número de habitantes no domicílio (incluindo o paciente) **{nhabitdom}**: _____

Nº de lactentes (incluindo o paciente) _____

Nº de pré-escolares _____

Nº de escolares _____

Nº de adolescentes _____

Nº de adultos _____

- (1) 1 a 3
- (2) 2 a 4
- (3) 4 a 6
- (4) > 6
- (5) Não sabe/não informou
- (6) Não se aplica

10. Fossa/ esgotamento sanitário **{sanit}**:

- (1) Não
- (2) Sim
- (3) Não sabe/não informou
- (4) Não se aplica

11. Água encanada no domicílio **{aguadom}**:

- (1) Não
- (2) Sim
- (3) Não sabe/não informou
- (4) Não se aplica

12. Recolhimento formal do lixo **{reclixo}**:

- (1) Não
- (2) Sim
- (3) Não sabe/não informou
- (4) Não se aplica

13. Eletricidade no domicílio **{eletrodom}**:

- (1) Não
- (2) Sim
- (3) Não sabe/não informou
- (4) Não se aplica

14. Local da residência **{locresid}**:

- (1) Zona da Mata
 - (2) Agreste
 - (3) Sertão
 - (4) RMR
 - (5) São Francisco
 - (6) Não sabe/não informou
 - (7) Não se aplica
- Nome da cidade: _____

15. Tipo de habitação **{hab}**:

- (1) Alvenaria
- (2) Taipa/ madeira
- (3) Outro. Qual? _____
- (4) Não sabe/não informou
- (5) Não se aplica

Antecedentes16. Cosanguinidade **{cosang}**

- (1) Não
- (2) Sim
- (3) Não sabe/não informou
- (4) Não se aplica

17. Condições de parto **{condparto}**

- (1) Normal em casa
- (2) Normal hospitalar
- (3) Cesariana
- (4) Não sabe/não informou
- (5) Não se aplica

18. Leite materno exclusivo **{aleitexcl}**

- (1) Não amamentou
- (2) 1 – 2 meses
- (3) 3 – 4 meses
- (4) 5 – 6 meses
- (5) Não sabe/não informou
- (6) Não se aplica

19. Aleitamento materno (tempo total) **{aleit}**

- (1) 1 – 2 meses
- (2) 3 – 4 meses
- (3) 5 – 6 meses
- (4) 6 – 12 meses
- (5) 12 – 24 meses
- (6) Não sabe/não informou
- (7) Não se aplica

20. Peso ao nascer **{pesonasc}**

- (1) <1000g
- (2) 1000g – 1500g
- (3) 1500g – 2000g

- (4) 2000g – 2500 g
- (5) 2500g – 3000g
- (6) 3000 – 4500g
- (7) > 4500g
- (8) Não sabe/não informou
- (9) Não se aplica

Características clínicas

21. Idade de início dos sintomas da doença {idinsint}

- (1) 0 – 1 ano
- (2) 1 – 2 anos
- (3) 2 – 6 anos
- (4) 6 – 10 anos
- (5) 10 – 17 anos
- (6) Não sabe/não informou
- (7) Não se aplica

22. Idade do diagnóstico da doença {iddiag}

- (1) 0 -1 ano
- (2) 1- 2 anos
- (3) 2-6 anos
- (4) 6-10 anos
- (5) 10-17 anos
- (6) Não sabe/não informou
- (7) Não se aplica

23. Sintomas e sinais iniciais {inicsintsin}

- (1) Diarreia
- (2) Dor abdominal
- (3) Hematoquezia
- (4) Melena
- (5) Febre
- (6) Perda de peso
- (7) Baixa estatura
- (8) Vômitos
- (9) Outros _____

24. Diagnóstico {diagn}

- (1) Retocolite ulcerativa
- (2) Doença de Crohn
- (3) Colite indeterminada

25. Classificação de Paris _____

26. Doenças associadas {doençassoc}

- 1. Doença de Hirschsprung
- 2. Imunodeficiência primária _____
- 3. Lúpus
- 4. Artrite reumatoide
- 5. Hepatite autoimune
- 6. Doença celíaca
- 7. Diabetes melitus insulino-dependente
- 8. Tireoidite
- 9. Psoríase
- 10. outras _____
- 11. não sabe/não informou
- 12. não se aplica

Exame físico

27. Estado nutricional no diagnóstico (Peso _____; estatura_____)

28. Peso diagnóstico **{pesodiag}**

- (1) < score -3
- (2) -3 score a -2 score
- (3) -2 score a -1 score
- (4) -1 score a +1 score
- (5) +1 score a +2 score
- (6) +2 score a +3 score
- (7) >+3 score

29. Estatura diagnostic **{estatdiag}**

- (1) < score -3
- (2) -3 score a -2 score
- (3) -2 score a -1 score
- (4) -1 score a +1 score
- (5) +1 score a +2 score
- (6) +2 score a +3 score
- (7) >+3 score

30. Estado nutricional atual (Peso _____; estatura_____)

31. Peso atual **{pesoatual}**

- (1) < score -3
- (2) -3 score a -2 score
- (3) -2 score a -1 score
- (4) -1 score a +1 score
- (5) +1 score a +2 score
- (6) +2 score a +3 score
- (7) >+3 score

32. Estatura atual **{estatatual}**

- (1) < score -3
- (2) -3 score a -2 score
- (3) -2 score a -1 score
- (4) -1 score a +1 score
- (5) +1 score a +2 score
- (6) +2 score a +3 score
- (7) >+3 score

33. Doenças auto-imunes em parentes de 1º grau **{autoimparent}**

- (1) Não
- (2) Sim
- (3) Não sabe/não informou
- (4) Não se aplica

34. Doença inflamatória intestinal em parentes de 1º grau **{diiparent}**

- (1) Não
- (2) Sim
- (3) Não sabe/não informou
- (4) Não se aplica

35. Infecções prévias **{infecprev}**

- (1) Pneumonia
- (2) Otite
- (3) Estomatite
- (4) Rotavírus
- (5) Diarreia agente_____
- (6) Celulite
- (7) Osteomielite

(8) Outras _____

36. Uso de antibióticos (número de vezes ____) {usoatb}

- (1) Não
- (2) Sim
- (3) Não sabe/não informou
- (4) Não se aplica

37. Manifestações extra-intestinais {manifextraint}

- (1) Artrite ou artralgia
- (2) Colangite
- (3) Eritema nodoso
- (4) Síndrome de Sweet
- (5) Pioderma gangrenoso
- (6) Pancreatite
- (7) Outras _____
- (8) Não sabe/não informou
- (9) Não se aplica

Dados endoscópicos e laboratoriais Características macroscópicas

Acometimento {acomet}:

- 38. () Reto
- 39. () canal anal
- 40. () sigmoide
- 41. () cólon descendente
- 42. () cólon transverso
- 43. () cólon ascendente
- 44. () ceco
- 45. () válvula íleo-cecal
- 46. () íleo
- 47. () duodeno
- 48. () estômago
- 49. () esôfago

Doença contínua {doencont}

- 50. () não
- 51. () sim

Características da mucosa {mucosa}:

- 52. () úlceras pequenas ou erosões
- 53. () úlceras serpinginosas
- 54. () úlceras aftosas isoladas
- 55. () úlceras aftosas difusas
- 56. () pedra de calçamento
- 57. () edema
- 58. () eritema
- 59. () granularidade
- 60. () friabilidade
- 61. () exsudato
- 62. () perda do padrão vascular

Características anatômicas {anatom}

- 63. () estenose ou estreitamento intestinal com dilatação pré-estenótica
- 64. () espessamento da parede do intestino com estreitamento do lúmen
- 65. () fistula perianal
- 66. () estenose perianal
- 67. () abscesso perianal
- 68. () tags grandes e inflamadas

69. () fissuras em linha média do ânus
 70. () tags pequenas

Exames
Diagnóstico

Hb _____ Hct _____
 Leucócitos _____ (Miel _____ Meta _____ Bastoes _____ segmentados _____ eos _____ LA _____ LT _____ mon _____)
 Plaquetas _____
 VHS _____ PCR _____ ferritina _____ FAN _____ albumina _____
 Asca _____ p-ANCA _____

Atuais

Hb _____ Hct _____
 Leucócitos _____ (Miel _____ Meta _____ Bastoes _____ segmentados _____ eos _____ LA _____ LT _____ mon _____)
 Plaquetas _____
 VHS _____ PCR _____ ferritina _____ FAN _____ albumina _____
 Asca _____ p-ANCA _____

Outros _____

Tomografia com enterografia

Ressonância com enterografia

Transito intestinal

Enema opaco

Análise laboratorial

DNA sangue _____

DNA tecido _____

RNA tecido _____

Citocinas sangue _____

Imunohistoquímica _____

Tratamento

Medicamento	Início	Fim
Corticoide (prednisona, metilprednisolona, budesonida, hidrocortisona)		
Mesalazina		
Azatioprina		
Metotrexate		
Ciclosporina		
Infliximabe		

Adalimumab		
Metronidazol		
ciprofloxacina		

APÊNDICE D

Características microscópicas

Histopatológico {histop}

71. () distorção arquitetural
72. () linfoplasmocitose basal
73. () inflamação transmural
74. () úlceras profundas
75. () úlceras em “V” (fissuras)
76. () granuloma Peri-criptal
77. () fibrose de submucosa
78. () granuloma não-caseoso
79. () infiltrado de lâmina própria não específico
80. () metaplasia de células de Paneth colônica
81. () depleção de células caliciformes
82. () inflamação crônica focal

(segundo Critérios de Porto)
Retocolite ulcerativa

Características macroscópicas	Características microscópicas
Reto	Reto
☐ Doença contínua a partir do reto	☐ Distorção arquitetural, linfoplasmocitose basal, doença mais grave distalmente, sem granulomas
☐ Sem doença no reto ou sigmoide	☐ Sem distorção arquitetural ou sinais de cronicidade
☐ Doença do cólon esquerdo do reto com áreas de inflamação cecal e áreas normais entre os dois	☐ Inflamação inespecífica no patch (ceco)
	☐ Inflamação transmural ou úlceras profundas, úlceras em forma de V (fissuras)
	☐ Sem agregados linfóides
Estômago	Estômago
☐ Erosões ou pequenas úlceras (não serpinginosas ou lineares) no estômago	☐ Gastrite difusa ou focal, sem granuloma (exceto por granuloma Peri-criptal)

Observações _____

Doença de Crohn

Características macroscópicas	Características microscópicas
Íleo e jejuno	Todo trato gastrointestinal
☐ Úlceras	☐ Inflamação crônica focal
☐ Úlceras no cólon	☐ Infiltrado inflamatório transmural
☐ Úlceras aftosas em mucosa	☐ Fibrose submucosa
☐ Úlceras lineares ou serpinginosas	☐ granuloma não caseoso (longe de uma cripta rota)
☐ Úlceras aftosas isoladas	☐ Granuloma adjacente a uma cripta rota
☐ Aspecto de pedra de calçamento	☐ Infiltrado de lâmina própria leve não específico
☐ Estenose ou estreitamento intestinal com dilatação pré-estenótica	☐ Ulceração ou erosão de mucosa
☐ Espessamento da parede do intestino com estreitamento do lúmen	☐ Distorção arquitetural
☐ Fístula perianal	☐ Metaplasia de células de paneth colônica
☐ Abscesso perianal	☐ Depleção de células de caliciformes
☐ Estenose anal	
☐ Úlceras no canal anal	
☐ “tags” grandes e inflamadas	
☐ Lesões salteadas	
☐ Edema	
☐ Eritema	
☐ Friabilidade	
☐ granularidade	
☐ Exsudato	

☐ Perda do padrão vascular	
☐ Fissuras em linha média do ânus	
☐ “tags” pequenas	

Observações_____

APÊNDICE E

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE
TÍTULO DA PESQUISA - DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES: AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Introdução. O Sr. (Sr.^a) está sendo convidada a participar dessa pesquisa, que tem como pesquisadores as gastroenterologistas pediátricas Michela Cynthia da Rocha Marmo e a Prof.^a Dr.^a Gisélia Alves Pontes da Silva, pesquisa que tem como finalidade avaliar alterações genéticas associadas à doença inflamatória intestinal.

A doença inflamatória intestinal é uma doença que acomete adultos e crianças, tendo dois tipos principais: a doença de Crohn e a retocolite ulcerativa. Quando ocorre em crianças pode ter evolução mais agressiva com complicações, como necessidades de cirurgias. Estas características da doença inflamatória intestinal em crianças estão associadas com defeitos genéticos que podem levar à inflamação do intestino típica da doença. Entender estas alterações genéticas pode trazer informações relacionadas à evolução da doença e resposta ao tratamento. Em alguns países já existem estudos que descrevem as alterações genéticas da população de crianças e adultos com doença inflamatória intestinal, aqui no Brasil existem poucos estudos sobre o assunto.

Se decidir participar desta pesquisa, é importante que você leia as informações a seguir, ou poderemos ler juntos. Se houver alguma palavra ou trecho que não esteja claro, estou à disposição para responder e esclarecer qualquer dúvida.

Procedimentos, riscos, desconfortos. Concordando em participar desse estudo, primeiro o Sr. (Sr.^a) responderá a um formulário, cujas perguntas serão feitas por mim, sobre a história desde o início da doença do seu filho. O prontuário do seu filho também será consultado. Mas, todas estas informações serão mantidas em sigilo absoluto, guardadas em um armário próprio, com chave, o qual só os pesquisadores principais terão acesso.

Para a análise genética, será necessária coleta de sangue por punção venosa, com agulha e seringa pela veia e estudo do material da biópsia feita durante a colonoscopia. A coleta de sangue será realizada no momento em que for feito coleta de sangue na rotina de acompanhamento do seu filho, ou seja, na rotina das consultas para controle da doença e/ou dos efeitos dos medicamentos. Neste momento, coletaremos 5,0 mL adicionais de sangue para enviar para avaliar a presença de genes associados à doença inflamatória intestinal. Em relação às biópsias, o material utilizado será resgatado de biópsias prévias armazenada no serviço de patologia do hospital e de biópsias feitas em colonoscopias realizadas por indicação médica durante o tratamento do seu filho. Esta coleta será feita por profissionais habilitados sem prejuízos ao seu filho de acordo com a rotina de acompanhamento da doença sem por em risco a saúde do seu filho e sem prejuízos financeiros.

Benefícios da pesquisa. O Sr. ou a Sr.^a estará contribuindo para sabermos se há alterações genéticas associadas à doença inflamatória intestinal nos pacientes que acompanhamos neste hospital. Caso estas alterações estejam presentes este conhecimento poderá nos esclarecer dúvidas em relação ao curso da doença destas crianças e poderá, também, colaborar para outros estudos futuros. Se houver alguma alteração genética com influência na doença do seu filho, você será comunicado durante as consultas médicas ou por

telefone pelo próprio pesquisador e as condutas possíveis e cabíveis relacionadas ao tratamento serão tomadas.

Decisão de participar, não participar ou desistir. O Sr ou a Sr.^a como convidados e voluntários desta pesquisa, possui total liberdade para aceitar ou recusar-se a participar, tendo também o direito de desistir da participação da pesquisa em qualquer momento. A sua recusa ou desistência não lhe trará nenhum prejuízo para o tratamento do seu filho, sendo-lhe assegurada total assistência.

Não existirá nenhuma cobrança de taxa ou recompensa financeira para os participantes desta pesquisa.

Em aceitando, o Sr. ou a Sr.^a receberá uma cópia deste Termo de Consentimento, da qual consta meu telefone (99454116) e o meu e-mail (michelamarmo@yahoo.com.br) para que possa esclarecer quaisquer dúvidas que venham surgir posteriormente sobre a pesquisa.

Termo de consentimento livre e esclarecido. Pelo presente instrumento, declaro que li, ou o médico (_____) leu por mim, as informações contidas neste documento antes de assiná-lo. Afirmando que fui suficientemente esclarecido sobre os procedimentos a que meu filho será submetido e nada além do que foi exposto neste termo com finalidade de avaliar as alterações genéticas associadas a doença inflamatória intestinal. Afirmando que entendo que esta pesquisa é um estudo sério realizado no IMIP e na Universidade Federal de Pernambuco, sem a necessidade de expor o nome do meu filho publicamente. Autorizo a divulgação dos resultados em qualquer evento de caráter científico, inclusive em revistas científicas. Compreendo também que sou livre para desistir em qualquer momento do estudo, sem sofrer nenhum prejuízo por conta disso. Confirmo também que recebi uma cópia deste Termo de Consentimento. Declaro que não tenho dúvida alguma, pois todas foram devidamente esclarecidas.

Pelo presente, manifesto assim minha concordância e meu livre consentimento para a realização dos procedimentos acima descritos.

Local e data: _____

Nome e assinatura do responsável: _____

Documento de identidade: _____

Testemunha 1 _____

Testemunha 2 _____

Assinatura do médico que obteve o consentimento

APÊNDICE F

Termo de assentimento

TERMO DE ASSENTIMENTO PARA MENORES DE 8 A 18 ANOS

Título do estudo: Doença Inflamatória Intestinal em crianças e adolescentes: avaliação de polimorfismos genéticos em hospital de referência do nordeste do Brasil.

Pesquisadora responsável: Michela Cynthia da Rocha Marmo

Nome da Instituição: UFPE - Universidade Federal de Pernambuco / IMIP – Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira

Telefone do Pesquisador: (81)99454116/ Telefone do Comitê de Ética: (81)21224756

Nome completo do participante: _____

Idade: _____ anos _____ meses

Você está sendo convidado a participar de um estudo que vai estudar as alterações genéticas associadas à doença inflamatória intestinal.

1. O que nós queremos saber?

Você tem uma doença chamada doença inflamatória intestinal e sabemos que a doença tem algumas alterações genéticas associadas que ajudam no surgimento da doença. Por isso gostaríamos de estudar se você tem algumas destas alterações.

2. O que vai acontecer comigo se eu participar?

Se você decidir participar do estudo, as alterações genéticas serão pesquisadas durante os seus exames de rotina que você faz para o acompanhamento da sua doença. As coletas de sangue e de biópsias serão realizadas no momento que você fizer exames de sangue e colonoscopia para o acompanhamento de rotina da doença, não sendo necessário realizar exames extras para o estudo.

3. Participar do estudo vai me ajudar?

Sua participação pode ajudar a entender melhor a sua doença e seu tratamento, podendo também ajudar outras crianças que tenham doença inflamatória intestinal.

4. Eu preciso participar deste estudo e eu posso desistir se eu quiser?

Se você não quiser participar deste estudo não tem problema. Ninguém ficara com raiva e seu médico vai cuidar de você da mesma maneira, mesmo não participando do estudo. E a qualquer momento você pode desistir de participar.

5. E se eu tiver perguntas?

Se você tiver qualquer dúvida, pode perguntar aos seus pais ou a mim (Dra Michela Marmo – 81 99454116). Se tiver dúvidas quanto aos seus direitos neste estudo, pode perguntar aos seus pais ou pedir que liguem para o Comitê de Ética do IMIP 2122 4756.

Importante: A sua participação nesse estudo é uma decisão sua. Mesmo que você comece a participar, você pode sair dele a qualquer momento.

☐

Por favor marque aqui se você concorda em participar deste estudo.

Assinatura do paciente

data

Assinatura do médico do estudo

data

ANEXO A

PUCAI

Item	Points
1. Abdominal pain	
• No pain	0
• Pain can be ignored	5
• Pain cannot be ignored	10
2. Rectal bleeding	
• None	0
• Small amount only, in <50% of stools	10
• Small amount with most stools	20
• Large amount (>50% of the stool content)	30
3. Stool consistency of most stools	
• Formed	0
• Partially formed	5
• Completely unformed	10
4. Number of stools per 24h	
• 0–2	0
• 3–5	5
• 6–8	10
• >8	15
5. Nocturnal stools (any episode causing waking)	
• No	0
• Yes	10
6. Activity level	
• No limitation of activity	0
• Occasional limitation of activity	5
• Severe restricted activity	10
<i>Sum of PUCAI (0–85)</i>	

ANEXO B

PCDAI



Pediatric Crohn's Disease Activity Index Calculator
 Pediatric Crohn's Disease Activity Index, Hyams et al.,
 Development and validation of a pediatric
 Crohn's disease activity index. J Pediatr Gastroenterol Nutr
 1991;12:439-447. [PubMed link]

History (Recall; 1 week)

Abdominal pain:

None ☒
Mild-- Brief, does not interfere with activities ☐
Mod/severe - daily, longer lasting affects activities, nocturnal ☐

Stools (per day):

Formed stools or up to 1 liquid stool, no blood ☒
Up to 2 semi-formed with small blood, or 2-5 liquid with or without small blood ☐
Any gross bleeding, or ≥ 6 liquid, or nocturnal diarrhea ☐

Patient Functioning -- General Well-Being

No Limitation of activities, well ☒
Occasional difficulty in maintaining appropriate activities, below par ☐
Frequent limitation of activity, very poor ☐

Laboratory (values obtained within the past week)

Sex: Age(whole years): Hematocrit %: ESR (mm/hr): Albumin (g/dl):

Examination

Weight

Weight gain or voluntary weight stable/loss ☐
Involuntary weight stable, weight loss 1-9% ☒
Weight loss $\geq 10\%$ ☐

Height: Score using (a) criteria when possible

(a) Height velocity $\geq -1SD$ ☒
Height velocity $< -1SD, > -2SD$ ☐
Height velocity $\leq -2SD$ ☐
(b) < 1 channel decrease ☐
 $\geq 1, < 2$ channel decrease ☐
 > 2 channel decrease ☐

Abdomen

No tenderness, no mass ☒
Tenderness, or mass without tenderness ☐
Tenderness, involuntary guarding, definite mass ☐

Perirectal disease

None, asymptomatic tags ☒
Inflamed tags or 1-2 indolent fistula(e) or fissure(s), scant drainage, no tenderness ☐
Active fistula, drainage, tenderness, or abscess ☐

Extra-intestinal Manifestations

(Fever $\geq 38.5^\circ C$ for 3 days over past week, oral ulcers, definite arthritis, uveitis, erythema nodosum, pyoderma gangrenosum)

None ☒
One ☐
 $\geq$ Two ☐

Final Score

Total Score:

ANEXO C

Instituto de Medicina Integral
Prof. Fernando Figueira
Escola de Pós-graduação em Saúde Materno Infantil
Instituição Civil Filantrópica



DECLARAÇÃO

Declaro que o projeto de pesquisa nº 4125 – 14 intitulado “Doença inflamatória intestinal em crianças e adolescentes: avaliação de polimorfismos genéticos em hospital de referência do Nordeste do Brasil” apresentado pela (o) pesquisadora (o) Michela Cynthia da Rocha Marmo foi APROVADO pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira – IMIP, em reunião ordinária de 11 de junho de 2014.

Recife, 19 junho de 2014


Dr. José Eulálio Cabral Filho
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa em Seres Humanos do
Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira

UTILIDADE PÚBLICA MUNICIPAL - Lei. 9851 de 08/11/67
UTILIDADE PÚBLICA ESTADUAL - Lei. 5013 de 14/05/64
UTILIDADE PÚBLICA FEDERAL - Dec. 86238 de 30/07/81
INSCRIÇÃO MUNICIPAL: 05.897-1
INSCRIÇÃO ESTADUAL - Isento
CNPJ: 10.988.301/0001-29

Rua dos Coelho, 300 Boa Vista
Recife - PE - Brasil - CEP: 50.070-550
PABX: (81) 2122.4100
Fax: (81) 2122.4722 Cx. Postal 1393
e-mail: imip@imip.org.br
www.imip.org.br

ANEXO D

De: Jornal de Pediatria EviseSupport@elsevier.com
Assunto: Successfully received: submission Etiopatogenia da doença
inflamatória intestinal na infância e adolescência. for Jornal de
Pediatria
Data: 6 de jun de 2017 04:06:09
Para: michelamarmo@gmail.com

This message was sent automatically. Please do not reply.

Ref: JPED_2017_443

Title: Etiopatogenia da doença inflamatória intestinal na infância e
adolescência.

Journal: Jornal de Pediatria

Dear Dr. Marmo,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in
Jornal de Pediatria. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at:
[http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?
JRNL_ACR=JPED](http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=JPED) and locate your submission under the header 'My
Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Jornal de Pediatria

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can
search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked
questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also
talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and
email.

Copyright © 2017 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No.
[33156677](#).