



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

ANTHONY ALVES DOS SANTOS JUNIOR

**ESTUDO HISTOPATOLÓGICO E AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS
FRENTE À ISOLADOS DE *Candida* OBTIDOS DE PACIENTES COM DOENÇAS
INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS**

Recife

2018

ANTHONY ALVES DOS SANTOS JUNIOR

**ESTUDO HISTOPATOLÓGICO E AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS
FRENTE À ISOLADOS DE CANDIDA OBTIDOS DE PACIENTES COM DOENÇAS
INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Área de Concentração: Biologia Aplicada à Saúde

Orientador: Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo Júnior
Dept^o. de Patologia – Universidade Federal de Pernambuco

Co-orientador: Prof. Dr^a Rejane Pereira Neves
Dept^o de Micologia – Universidade Federal de Pernambuco

Recife

2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Santos Junior, Anthony Alves dos

Estudo histopatológico e avaliação de compostos bioativos frente a isolados de *Candida* obtidos de pacientes com doenças inflamatórias intestinais / Anthony Alves dos Santos Junior - 2019.

92 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Mário Ribeiro de Melo Júnior

Coorientadora: Rejane Pereira Neves

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde. Recife, 2019.

Inclui referências, apêndices e anexo.

1. Doença de Crohn 2. Retocolite ulcerativa 3. *Candida*
I. Melo Júnior, Mário Ribeiro de (orient.) II. Neves, Rejane Pereira (coorient.) III. Título

616.34

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-310

ANTHONY ALVES DOS SANTOS JUNIOR

**ESTUDO HISTOPATOLÓGICO E AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS
FRENTE À ISOLADOS DE CANDIDA OBTIDOS DE PACIENTES COM DOENÇAS
INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovada em: 10/08/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo Júnior (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Bruno Severo Gomes (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a Maria Daniela Silva Buonafina (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pelo amor infinito que Ele sente por mim e por ter sonhado comigo e preparado todos os caminhos para que eu chegasse até aqui.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo Júnior por ter aceitado embarcar comigo nessa jornada e por todo o apoio ao longo desses dois anos de parceria.

À minha co-orientadora Prof^a Dr^a Rejane Pereira neves pelo suporte e incentivo oferecido durante todo o curso.

Ao professor querido, Dr. Bruno Severo Gomes, por ser tão presente em todas as etapas da minha vida acadêmica e pessoal, por todos os conselhos, zelo, e por ser esse ser humano tão iluminado que eu tanto admiro.

À Dr^a Maria Daniela Silva Buonafina (Dani), por toda a ajuda com tudo e por ter aceitado com carinho o convite para composição desta banca.

À Prof^a Dr^a Cristina Maria de Souza Motta por ter me recebido carinhosamente no laboratório de Taxonomia e Biotecnologia e confiado em mim, abrindo as portas do laboratório para o desenvolvimento das etapas deste projeto.

Aos meus pais e familiares, que tanto amo, por todo o amor e carinho nestes anos em que existo e por toda a confiança no profissional que me tornei. Vocês me impulsionam todos os dias durante minha caminhada acadêmica.

À minha namorada Rebeca, por tanto amor, compreensão e paciência neste período conturbado, por sacrificar comigo tantas noites e fins de semana e pela imensa ajuda na elaboração deste trabalho.

À minha sogra Lala, pelo cuidado e amor comigo e por me incentivar no meu crescimento profissional.

As minhas duas sobrinhas Elise e Emília por serem luz na minha vida

Aos amigos amados do laboratório de Taxonomia e Biotecnologia da Micoteca URM, Roberta, Juliana, Marília Maciel, Joenny, Julyanna, Alba, Henrique e Marcela pela companhia, apoio mútuo, e por ajudar a deixar esse período mais leve.

Aos amigos do laboratório de Micologia Médica e Imunodiagnóstico de Micoses Sistêmicas, Adryele, Michel, Franz, Melyna, Ertenia e Carlos, pelas risadas e compartilhamento de tantos momentos bons.

A todos do Grupo de Pesquisa em Processos Patológicos (GP3), em especial, a Ana Paula Fernandes da Silva por todo o apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde e do LIKA por dividirem comigo tantas coisas boas e por toda a ajuda durante esses anos.

Aos colegas do setor de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFPE, pelo apoio e amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES pelo apoio financeiro.

Aos pacientes atendidos que aceitaram participar desta pesquisa tornando possível a realização deste estudo, minha homenagem e sinceros agradecimentos especiais.

Muito obrigado!

RESUMO

As doenças inflamatórias intestinais (DII) incluem a doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa (RCU). São condições de etiologia inespecífica, porém acredita-se que fatores ambientais, imunológicos e inflamatórios desempenhem um papel importante em sua patogênese. Além disso, um dos principais fatores de risco associados à patogenia das DII são os microrganismos. O presente trabalho teve como objetivo realizar o estudo histopatológico e avaliação de compostos bioativos frente a isolados de leveduras do gênero *Candida* obtidos de pacientes com DII tratados no Hospital das Clínicas de Pernambuco HC – UFPE. Dos 129 pacientes avaliados, sendo 34,10% dos casos de DC, 63,56% de RCU e 2,32% de colite indeterminada. A faixa de idade mais acometida pelas DII entre os pacientes foi de 46-65 anos (36,43%). A Mesorregião Metropolitana do Recife apresentou-se como a principal zona residencial dos acometidos, com 59% dos casos. O principal fármaco utilizado para o tratamento das DII foi a Mesalazina, com 29,45% dos casos. Foram estudados 63 pacientes para a pesquisa de candidíase associada a DII. Cinco (5) pacientes portadores de DC e RCU apresentaram candidíase confirmada. Os isolados foram identificados como sendo duas cepas de *Candida albicans*, duas cepas de *C. glabrata* e uma cepa de *C. lusitanae*, e demonstraram alta capacidade de produção de biofilme. Em relação ao perfil de sensibilidade frente aos antifúngicos convencionais e à miltefosina, as leveduras apresentaram concentrações inibitórias mínimas para a miltefosina menores ou iguais quando comparadas à Anfotericina B. A maior parte dos isolados também apresentou sensibilidade frente às equinocandinas. Já as cepas de *C. glabrata* apresentaram resistência à caspofungina. As análises histopatológicas dos tecidos obtidos dos pacientes com DII apresentaram morfologia com criptas irregulares, fissuras epiteliais, formação de granuloma e infiltrado inflamatório. Também foi detectada nesses pacientes uma maior expressão de calprotectina e ADAM10 nos tecidos avaliados através de imunoquimioluminescência. Este trabalho ratifica a relevância de estudos que visam investigar a associação das DII com infecções microbianas, além da necessidade em identificar novos biomarcadores para o diagnóstico da doença, auxiliando no tratamento e melhor qualidade de vida para os acometidos.

Palavras-chave: Doença de Crohn. Epidemiologia. Imunoquimioluminescência. Miltefosina. Retocolite ulcerativa.

ABSTRACT

Inflammatory bowel diseases (IBD) include Crohn's disease (DC) and ulcerative colitis (UC). These conditions are non-specific etiology, but it is believed that environmental, immunological and inflammatory factors play an important role in their pathogenesis. In addition, one of the main risk factors associated with IBD pathogenesis are microorganisms. The present study aimed performing the histopathological study and evaluation of bioactive compounds against yeasts *Candida* genus obtained from patients with IBD and treated at Hospital das Clínicas de Pernambuco HC - UFPE. Among the 129 patients evaluated, 34.10% of CD cases, 63.56% of UC and 2.32% of undetermined colitis cases. The most affected age range by IBD was 46-65 years (36.43%). The Metropolitan Meso-Region of Recife was the main residential area of the affected, with 59% of the cases. The major drug used for IBD treatment was mesalazine, with 29.45% of the cases. A total of 63 patients were studied for the investigation of candidiasis associated with IBD. Five (5) patients with CD and UC had confirmed candidiasis. The isolates were identified as two *Candida albicans* strains, two *C. glabrata* strains and one *C. lusitaniae* strain, which demonstrated high biofilm production capacity. In relation to conventional antifungals and miltefosine sensitivity profile, yeasts showed minimal inhibitory concentrations for miltefosine, which were smaller or equal when compared to Amphotericin B. Most of isolates also showed sensitivity to echinocandins. On the other hand, *C. glabrata* strains demonstrated resistance to caspofungin. Histopathological analyzes of the tissues obtained from patients with IBD presented morphology with irregular crypts, epithelial fissures, granuloma formation and inflammatory infiltrate. In these patients, a higher expression of calprotectin and ADAM10 were also detected in the tissues evaluated by immunochemiluminescence. This work ratifies the importance of studies aimed at investigating the association of IBD with microbial infections, as well as the need to identify new biomarkers for the diagnosis, assisting the treatment and improving life quality for the patients.

Keywords: Crohn's disease. Epidemiology. Immunochemiluminescence. Miltefosine. Ulcerative colitis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Características que diferem Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa	18
Figura 2 – Localização anatômica das lesões na doença de Crohn	19
Figura 3 – Localização anatômica das lesões na retocolite ulcerativa	20
Figura 4 – Cortes histológicos da Retocolite Ulcerativa e Doença de Crohn. A: Vista com ampliação média da mucosa colônica na Retocolite Ulcerativa, mostrando inflamação mista difusa, linfoplasmocitose basal, atrofia das criptas, e irregularidade com erosão superficial. B: Vista com ampliação média da colite na Doença de Crohn, mostrando inflamação mista e crônica, atrofia das criptas, e pequenos granulomas epitelióides da mucosa.	21
Figura 5 – Epidemiologia das Doenças Inflamatórias Intestinais	22
Figura 6 – Um modelo de patogenia da DII. Aspectos da doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa	23
Figura 7 – Diagnóstico diferencial da Retocolite Ulcerativa e Doença de Crohn com outras doenças.....	27

Artigo 1

Figura 1 – Zona de residência dos pacientes acometidos com doenças inflamatórias intestinais atendidos no setor de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFPE no período de agosto de 2015 a agosto de 2017.....	44
--	----

Artigo 2

Figura 1 – Quantificação do biofilme produzido pelos isolados obtidos utilizando método de cristal violeta. Cepas: Candida albicans (25A); Candida glabrata (22A); Candida albicans (27A); Candida glabrata (28A) e Candida albicans (ATCC 90028). Os dados foram expressos como média \pm DP. Teste t foi realizado considerando $p < 0.05$	59
---	----

Figura 2 – Análise histológica de pacientes portadores de doenças inflamatórias intestinais com infecção por *Candida* associada. (▲): Criptas desorganizadas com superfícies irregulares; (●): Infiltrado inflamatório; (◆): Granuloma; (■): Presença intensa de mucinas e glicoproteínas marcadas em azul; (→): Fissura do tecido epitelial intestinal. (A1): Coloração de Tricrômico de Masson em 400x de magnificação. (A2): Coloração de Hematoxilina-Eosina em 100x de magnificação. (A3): Coloração de Azul de Alcian e Ácido Periódico de Shiff em 400x de magnificação. (B1): Coloração de Azul de Alcian e Ácido Periódico de Shiff em 100x de magnificação. (B2): Coloração de Hematoxilina-Eosina em 100x de magnificação. (B3): Coloração de Azul de Alcian e Ácido Periódico de Shiff em 100x de magnificação.....61

Figura 3 – Comparação entre a imunoquimioluminescência, da doença de Crohn, da retocolite ulcerativa e do controle marcado com AntiCalprotectina-EA e AntiADAM10-EA. Foram observadas variações estatisticamente significativas entre os valores de ULR das doenças inflamatórias intestinais e o controle considerando $p < 0.05$63

LISTA DE TABELAS

Artigo 2

Tabela 1 – Identificação proteômica dos isolados obtidos utilizando MALDI-TOF MS	58
Tabela 2 – Identificação dos isolados obtidos utilizando biologia molecular	59
Tabela 3 – Concentrações Inibitórias Mínimas dos fármacos antifúngicos e da Miltefosina contra as cepas de Candida isolada dos pacientes acometidos com DII....	60

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AB	Azul de Alcian
ADAM10	Desintegrin and Metalloproteinase Domain-containing protein 10
ASCA	Anticorpos anti- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ATCC	American Type Culture Collection
ATG16L1	Autophagy related protein 16-like 1
CARD15	Caspase recruitment domain-containing protein 15
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CHCA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
COX	Enzimas Ciclooxygenases
CPRM	Colangiopancreatografia de ressonância magnética
DC	Doença de Crohn
DII	Doenças Inflamatórias Intestinais
EA	Éster de Acridina
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HC – UFPE	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco
HE	Hematoxilina-Eosina
IL	Interleucina (17-5-6-4)
INF- γ	Interferon Gama
IRGM	Immunity-related GTPase family M protein
KOH	Hidróxido de Potássio
LRRK2	Leucine-rich repeat kinase 2
MALDI	TOF MS – Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Mass Spectrometry
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MTF	Miltefosina
NaOH	Hidróxido de Sódio
NK	<i>Natural killer</i>
NOD2	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2
p-ANCA	Anticorpo antineutrofílico perinuclear

PAS	Ácido Periódico de Shiff
PBS	Tampão Fosfato Salina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PTPN2	Protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 2
RCU	Retocolite Ulcerativa
SDA	Sabouraud Dextrose Ágar
SM	Síndrome Metabólica
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TFA	Ácido trifluoroacético
TGI	Trato gastrointestinal
TM	Tricrômico de Masson
TNF α	Fator de Necrose Tumoral
ULK1	Alfa
ULR	Unc-51 like autophagy

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVOS	16
1.1.1 Objetivos gerais	16
1.1.2 Objetivos específicos.....	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS (DII)	18
2.1.1 Doença de Crohn.....	18
2.1.2 Retocolite Ulcerativa	20
2.2 EPIDEMIOLOGIA DAS DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS	21
2.3 IMUNOLOGIA DAS DII	22
2.4 ASPECTOS GENÉTICOS OBSERVADOS EM DII	23
2.5 SINTOMAS E COMPLICAÇÕES DAS DII	24
2.6 DIAGNÓSTICO DE DII E DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL	25
2.7 TRATAMENTOS PARA AS DII.....	27
2.8 MICRORGANISMOS ASSOCIADOS ÀS DII	29
2.8.1 O gênero <i>Candida</i> e sua relação com as DII	30
2.9 RESISTÊNCIA ANTIFÚNGICA.....	30
2.10 NOVAS MOLÉCULAS BIOATIVAS COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	32
2.10.1 Miltefosina.....	32
3 METODOLOGIA	34
3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	34
3.2 ASPECTOS ÉTICOS	34
3.3 REALIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO E ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS	34
3.4 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS UTILIZANDO MALDI – TOF/MS.....	35
3.5 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POR BIOLOGIA MOLECULAR	36
3.6 CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE BIOFILME UTILIZANDO CRISTAL VIOLETA	37

3.7 TESTES DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA <i>IN VITRO</i>	37
3.8 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO	38
3.9 ESTUDO IMUNOQUIMIOLUMINESCENTE	38
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 ARTIGO 1 – PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE PACIENTES PORTADORES DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS ATENDIDOS NO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DE PERNAMBUCO HC – UFPE.....	40
4.2 ARTIGO 2 – DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL ASSOCIADA À INFECÇÃO POR <i>CANDIDA</i> : ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA, DETECÇÃO QUIMIOLUMINESCENTE E PERFIL DE SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS	49
5 CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS.....	76
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	82
APÊNDICE B – FICHA CLÍNICA.....	86
ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS.....	88

1 INTRODUÇÃO

As Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) são doenças de etiologia desconhecida, que envolvem uma resposta patológica da imunidade inata e adquirida, levando à inflamação crônica do trato gastrointestinal (GISBERT; MARÍN; CHAPARRO, 2016). Os principais distúrbios que compreendem as DII são a doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa (RCU). Ambas apresentam remissão frequente e geram sérias complicações gastrointestinais levando por vezes o paciente à internação (OLIVEIRA et al., 2018).

Nas últimas décadas, a prevalência de DII na América Latina, incluindo o Brasil, tem aumentado. O pico de incidência da doença ocorre em pacientes jovens, entre 20 e 40 anos, que conseqüentemente se ausentam do trabalho, causando impactos socioeconômicos. Uma recente revisão investigou os números de DII na Europa e apontou para custos indiretos que variam de 6.704 a 8.973€ por ano (KAWALEC et al., 2015). De acordo com a Crohn's & Colitis Foundation of America a carga financeira anual total da DII nos EUA é de U\$ 14,6-31,6 bilhões (CCFA, 2018). No Brasil, um estudo de 2017 revelou que o INSS (Instituto Nacional do Seguro Social) gasta cerca de R\$ 66 milhões anualmente com licenças médicas por DC e RCU no país (FRÓES et al., 2018).

Embora a doença inflamatória intestinal seja idiopática, é sabido que as causas estão relacionadas à uma interação entre genes, o sistema imunológico e fatores ambientais (KUMAR et al., 2010). Um dos elementos que merecem destaque nas causas das DII são os agentes infecciosos. Microrganismos como *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shiguela*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Citomegalovírus*, *Helicobacter pylori*, *Clostridium difficile* e *Saccharomyces cerevisiae* têm sido relatados em pacientes (VAN KRUININGEN et al., 2007; MARTINELLI, 2013; GOMES, 2014; SANTOS, 2016). Além disso, mudanças na microbiota natural e resposta imunológica exacerbada contra microrganismos comensais também podem ser observadas (KUMAR et al., 2010; LONGO; FAUCI, 2015).

Fungos do gênero *Candida* são leveduras comensais e benignas, encontradas em vários sítios corpóreos em seres humanos como boca, pele e trato gastrointestinal. Normalmente não causam doenças em indivíduos saudáveis. No entanto, algumas espécies de *Candida* como por exemplo *C. albicans* podem causar infecções na pele,

membranas ou mucosas e podem se disseminar rapidamente, sendo mais susceptíveis indivíduos portadores de diabetes ou com queimaduras superficiais, pacientes com cateter e imunossuprimidos (KUMAR et al, 2010). A candidíase não tratada pode se disseminar via corrente sanguínea em pacientes imunossuprimidos ou imunodeficientes podendo causar choque séptico, evoluindo para óbito (SIMÕES, 2018).

Alguns estudos observaram que pacientes com DC possuem duas vezes mais leveduras como *C. albicans* no trato gastrointestinal que indivíduos saudáveis (CARRIÈRE, 2014; CAMMAROTA et al., 2015). Esta desregulação na microbiota intestinal pode favorecer o crescimento descontrolado da população de leveduras do gênero *Candida*, causando infecções intestinais (HOLD et al., 2014).

Nos últimos anos, o uso indiscriminado de antifúngicos combinados com terapia empírica tem sido um dos principais fatores para o desenvolvimento de resistência de leveduras do gênero *Candida* aos medicamentos utilizados na prática clínica (ÁVILA et al., 2016). Essa resistência aos fármacos convencionais e a quantidade de efeitos adversos associados (como anemia, doenças hepáticas e renais, dentre outros) têm alimentado a procura por novas moléculas candidatas a antifúngicos, a fim de melhorar a qualidade de vida dos pacientes portadores de micoses oportunistas (MOREIRA et al., 2017).

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a incidência de candidíase em pacientes portadores de DII do Hospital das Clínicas – UFPE, avaliar seu perfil histopatológico e o perfil de sensibilidade das leveduras isoladas frente a drogas antifúngicas *in vitro*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivos gerais

Verificar a ocorrência de candidíase em pacientes portadores de Doenças Inflamatórias Intestinais avaliando seu perfil histopatológico, bem como, o perfil de sensibilidade das leveduras isoladas frente à compostos bioativos com potencial antifúngico *in vitro*.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar o perfil epidemiológico dos pacientes portadores de DII atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco;
- Realizar diagnóstico micológico a partir das amostras clínicas obtidas;
- Identificar os isolados obtidos através de técnica automatizada de espectrometria de massas MALDI – TOF/MS e através de biologia molecular;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima dos antifúngicos utilizados na prática clínica e da Miltefosina frente aos isolados obtidos utilizando testes de sensibilidade antifúngica;
- Avaliar a capacidade de produção de biofilme das leveduras obtidas;
- Realizar estudo histopatológico das amostras coletadas;
- Detectar através de imunoquimioluminescência a presença de ADAM-10 e Calprotectina nas biópsias obtidas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS (DII)

Se caracteriza como Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) a Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RCU). São doenças imunomediadas que apresentam curso remissivo e são responsáveis por gerar complicações mais exacerbadas em problemas gastrointestinais, por vezes, tornando necessário a internação dos pacientes (OLIVEIRA et al., 2018). A distinção entre a DC e RCU baseia-se normalmente na distribuição do local afetado. Na figura 1 estão sintetizadas algumas características encontradas em ambas as patologias.

Figura 1 – Características que diferem Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa

Características	Doença de Crohn	Colite Ulcerativa
MACROSCÓPICA		
Região intestinal	Íleo ± cólon	Somente cólon
Distribuição	Lesões em salto	Difusa
Estenose	Sim	Rara
Aparência da parede	Espessa	Fina
MICROSCÓPICA		
Inflamação	Transmural	Limitada à mucosa
Pseudopólipos	Moderados	Marcada
Úlceras	Profundas, tipo "lâmina"	Superficial, base ampla
Reação linfoide	Marcada	Moderada
Fibrose	Marcada	Nenhuma ou leve
Serosite	Marcada	Nenhuma ou leve
Granulomas	Sim (~35%)	Não
Fístulas/Seios	Sim	Não
CLÍNICA		
Fístula perianal	Sim (na doença colônica)	Não
Má absorção de gordura/vitamina	Sim	Não
Potencial maligno	Com envolvimento colônico	Sim
Recorrência após a cirurgia	Comum	Não
Megacólon tóxico	Não	Sim

Observação: todas as características podem não estar presentes em um único caso.

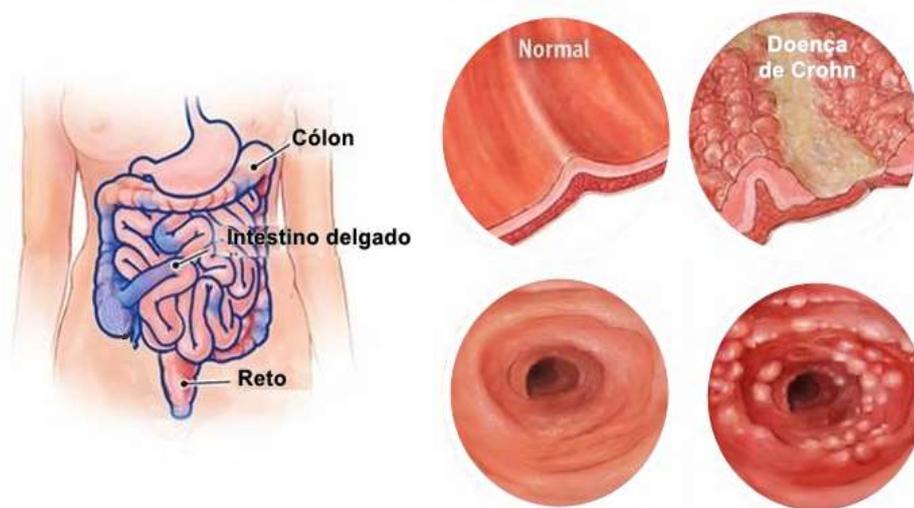
Fonte: KUMAR et al. (2010).

2.1.1 Doença de Crohn

A doença de Crohn foi relatada inicialmente no ano de 1932 por Burril B. Crohn, que a descreveu como uma doença com acometimento inflamatório crônico no intestino delgado que ocasionava um processo de fibrose na parede do intestino

levando a outras complicações (STEVENS; LOWE, 2002). Samuel Wilks foi o responsável por reconhecer a Retocolite Ulcerativa no ano de 1859, após uma autópsia, avaliando o comprometimento da mucosa do cólon (COWARD; KAPLAN, 2017).

Figura 2 – Localização anatômica das lesões na doença de Crohn



Fonte: Athersys Incorporation (<http://www.athersys.com/inflammatory-bowel-disease>).

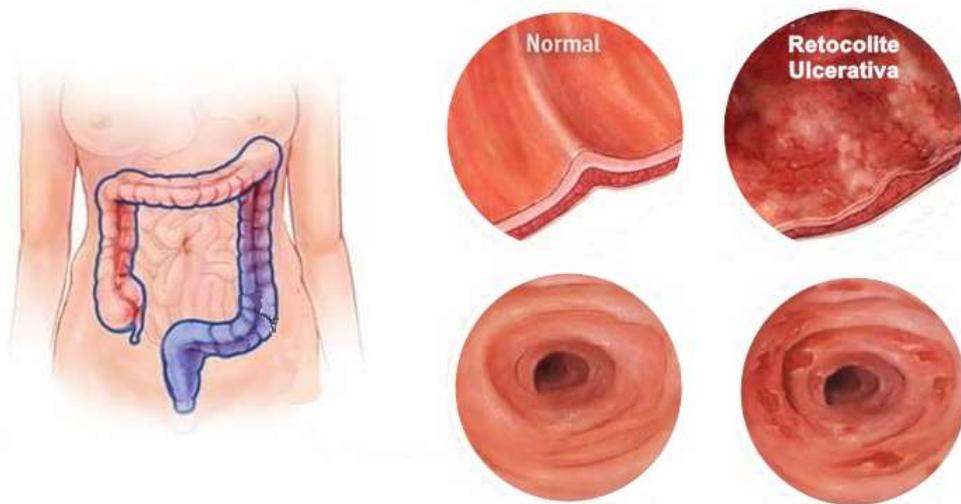
Na Doença de Crohn a inflamação pode ocorrer em todo trato gastrointestinal. Em cerca de 40% dos pacientes o acometimento se resume ao intestino delgado, de 40% a 55% apresentam acometimento nos intestinos delgado e grosso e cerca de 15% a 25% apenas colite. Diferentemente da RCU na DC a porção retal quase nunca é acometida. Na DC ocorre inflamação focal, espessamento da parede intestinal com formação de fibrose, por vezes, apresentando fístulas (LONGO; FAUCI, 2015).

Histologicamente a DC apresenta ulcerações aftóides, abscessos das criptas com agregação de macrófagos que formam granulomas. Estes granulomas podem ser encontrados em no fígado, pâncreas, linfonodos e mesentério. Possui outras características histológicas como agregados linfóides submucosos ou subserosos, inflamação transmural e fissuras na parede intestinal. (LONGO; FAUCI, 2015; CARDOSO, 2016).

2.1.2 Retocolite Ulcerativa

A Retocolite Ulcerativa é limitada a acometer a mucosa do cólon a partir da porção distal do reto podendo acometer todo o intestino grosso, fenômeno conhecido como pancolite. O acometimento intestinal se dá de forma contínua com diferenciação das áreas inflamadas em relação as áreas saudáveis próximas (QUILICI et al., 2010).

Figura 3 – Localização anatômica das lesões na retocolite ulcerativa



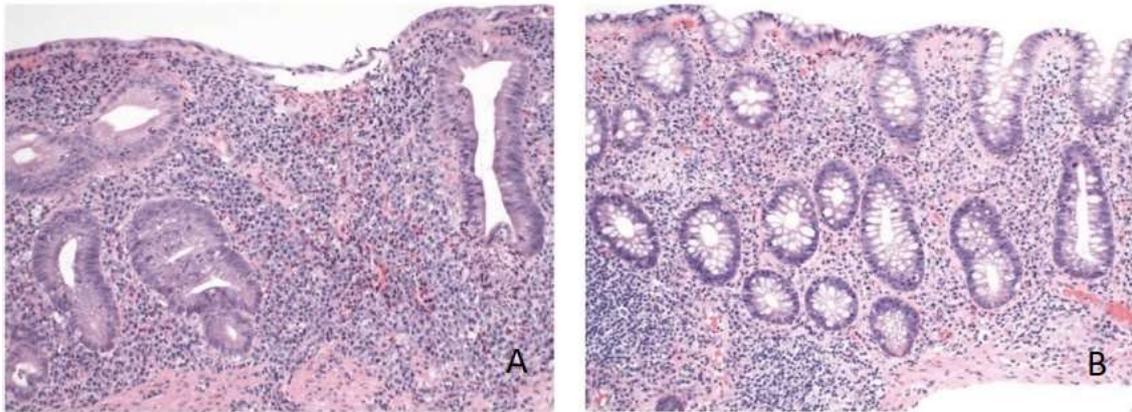
Fonte: Athersys Incorporation (<http://www.athersys.com/inflammatory-bowel-disease>).

A RCU apresenta alguns aspectos macroscópicos como eritemas apresentando superfície ligeiramente granular, se a inflamação for leve. No caso de inflamação mais grave, pode apresentar mucosa hemorrágica, ulcerada e edemaciada, podendo apresentar também, a presença de pseudopólipos como resultado da regeneração epitelial (LONGO; FAUCI, 2015; CARDOSO, 2016).

Microscopicamente, o processo inflamatório fica limitado a mucosa e submucosa sem acometimento de regiões mais profundas, exceto na doença fulminante. Apresentam criptas com arquiteturas distorcidas e na maioria das vezes apresentam espaços vazios entre as bases das criptas e a região muscular da

mucosa. Os neutrófilos por vezes invadem o epitélio dando origem a uma inflamação nas criptas podendo evoluir para abscessos (KUMAR et al., 2010; LONGO; FAUCI, 2015).

Figura 4 – Cortes histológicas da Retocolite Ulcerativa e Doença de Crohn. A: Vista com ampliação média da mucosa colônica na Retocolite Ulcerativa, mostrando inflamação mista difusa, linfoplasmocitose basal, atrofia das criptas, e irregularidade com erosão superficial. B: Vista com ampliação média da colite na Doença de Crohn, mostrando inflamação mista e crônica, atrofia das criptas, e pequenos granulomas epitelióides da mucosa.



Fonte: LONGO; FAUCI (2015).

2.2 EPIDEMIOLOGIA DAS DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS

De acordo com estudos, tem sido observada uma prevalência de DII em pacientes de raça branca, com picos entre 20 e 40 anos e um segundo pico após os 55 anos (ARANTES et al., 2017). Segundo a World Gastroenterology Organization Practice Guidelines (WGO) (2015) um estudo de revisão foi publicado baseado em estudos de populações com DII da Europa, Àsia, Oriente Médio e América do Norte comunicando os respectivos valores de incidência e prevalência nestas regiões, apresentando aumento estatisticamente significativo dessas comorbidades.

A relação entre homens e mulheres para a RCU é de 1:1 e para a DC de 1,1 a 1,8:1. As populações judaicas têm uma frequência de duas a quatro vezes maiores de serem acometidas por DC e RCU. As áreas urbanas apresentam maior prevalência

de DII que as áreas rurais, e as classes socioeconômicas mais elevadas apresentam prevalência mais alta que as classes socioeconômicas mais baixas.

A incidência de DC na América do Sul vai de 1-3 casos a cada 100.000 habitantes subindo para 3-4 em 100.000 habitantes em áreas urbanas do Brasil (VICTORIA; SASSAK; NUNES, 2009). Existem poucas informações epidemiológicas sobre pacientes com DII em países em desenvolvimento como o Brasil. Porém, vários estudos têm mostrado um aumento da prevalência e incidência das DII ao longo dos anos em vários países no mundo sugerindo a globalização das doenças (WGO, 2015).

Acredita-se que os números superiores de incidência em países desenvolvidos e em desenvolvimento esteja diretamente relacionado com a “hipótese da higiene” que defende a ideia de que pessoas menos expostas a infecções durante a vida não adquirem microrganismos que promovem um melhor desenvolvimento das células do sistema imunológico, produzindo uma resposta ineficiente. Estas pessoas são mais susceptíveis a doenças crônicas de caráter imunológico, dentre estas, as DII (SOOD et al., 2014).

Figura 5 – Epidemiologia das Doenças Inflamatórias Intestinais

	Colite ulcerativa	Doença de Crohn
Incidência (América do Norte) por pessoas-ano	2,2 a 14,3/100.000	3,1 a 14,6/100.000
Idade por ocasião do início	15 a 30 e 60 a 80	15 a 30 e 60 a 80
Etnia	Judeu > branco não judeu > afro-americano > hispânico > asiático	
Relação homens:mulheres	1:1	1,1 a 1,8:1
Fumo	Pode prevenir a doença	Pode causar a doença
Contraceptivos orais	Nenhum aumento do risco	Relação de probabilidade de 1,4
Apendicectomia	Protetora	Não é protetor
Gêmeos monozigotos	6% de concordância	58% de concordância
Gêmeos dizigotos	0% de concordância	4% de concordância

Fonte: LONGO; FAUCI (2015).

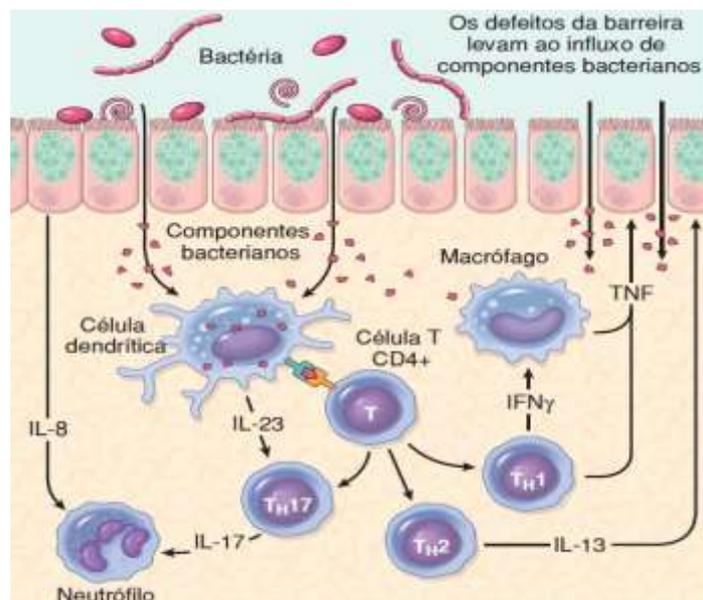
2.3 IMUNOLOGIA DAS DII

Nas DII ocorre inflamação crônica em toda a mucosa intestinal de causa multifatorial incluindo fatores ambientais, imunológicos e genéticos com mecanismos não estabelecidos completamente (GREGORY et al., 2017).

Pressupõe-se que indivíduos com fatores genéticos predisponentes associados a alguns fatores ambientais promovem uma resposta imune descontrolada, responsável por uma inflamação crônica no intestino. Nestes pacientes, também, é observada perda da tolerância aos microrganismos da microbiota intestinal natural (CARVALHO, 2017).

A principal causa da inflamação nas doenças inflamatórias intestinais parece ser uma resposta exacerbada de linfócitos T auxiliares frente a um patógeno. Estas células podem ser de três tipos, e todos os três tipos estão associados com as DII. Na DC prevalece a resposta do tipo Th1, aumentando a liberação de $\text{INF-}\gamma$, porém, resposta do tipo Th17, também já foi descrita, células que secretam IL-17. Na RCU a resposta prevalente é a do tipo Th2 que secretam citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, embora respostas Th17 tem sido observadas, em menor número que na DC (KUMAR et al., 2010).

Figura 6 – Um modelo de patogenia da DII. Aspectos da doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa



Fonte: KUMAR et al. (2010).

2.4 ASPECTOS GENÉTICOS OBSERVADOS EM DII

Estudos genéticos têm identificado vários genes relacionados às DII. Quase todos os genes identificados até agora, apresentam risco absoluto baixo, porém, faz-se necessário suas respectivas identificações a fim de produzir futuros marcadores para diagnóstico ou novos alvos terapêuticos (WGO, 2015).

A descoberta de genes como NOD2/CARD15 (nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2) ou (caspase recruitment domain-containing protein 15) ajudaram a elucidar a fisiopatologia das DII que deixaram de ser consideradas doenças autoimunes e passaram a ser consideradas doenças de desregulações imunológicas (CORRIDONI; ARSENEAU; COMINELLI, 2014).

Este gene é responsável pela codificação de um receptor intracelular que reconhece constituintes da parede celular de bactérias. Quando há mutação do NOD2/CARD15 há uma diminuição na capacidade do sistema imunológico de reconhecer antígenos bacterianos aumentando a susceptibilidade do indivíduo desenvolver DC (HOLD et al., 2014).

Já foram descritas mutações do gene (ATG16L1, autophagy related protein 16-like 1) e IRGM (immunity-related GTPase family M protein) em pacientes portadores de DC. Estes genes estão relacionados com o reconhecimento e resposta contra patógenos e corroboram a teoria de que as respostas imunológicas desreguladas a patógenos intestinais são um importante componente da patogenia da DII (KUMAR et al., 2010; LONGO; FAUCI, 2015).

Mutações em outros genes também já foram descritas em pacientes com DC como o ULK1 (unc-51 like autophagy activating kinase 1), LRRK2 (leucine-rich repeat kinase 2) e PTPN2 (protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 2) genes relacionados com autofagia. Nenhum destes genes está relacionado com a Retocolite Ulcerativa. Porém, polimorfismos na ECM1 que é uma proteína de matriz extracelular responsável por inibir a metaloproteinase de matriz 9, estão associados a RCU, mas não a DC. Estudos mostram que a inibição da metaloproteinase de matriz 9 reduz a gravidade da colite em modelos experimentais. (KUMAR et al., 2010; CARRIÈRE, 2014).

2.5 SINTOMAS E COMPLICAÇÕES DAS DII

Em geral a os sintomas das DII dependem do seguimento do trato intestinal envolvido. A retocolite ulcerativa é limitada ao cólon e ao reto e se estende apenas a mucosa e submucosa. A doença de Crohn (também conhecida como ileíte regional) pode acometer qualquer trecho de todo o trato gastrointestinal sendo comumente transmural (LONGO; FAUCI, 2015).

São classificados como sintomas intestinais e extra intestinais. Os sintomas intestinais mais comuns são diarreias muco-sanguinolentas, constipamento, sangramento retal, dores abdominais e tenesmo. Já os sintomas extra intestinais vão de acometimentos músculo-esqueléticos (artropatias axiais ou periféricas), acometimentos cutâneos (eritema nodoso e pioderma gangrenoso) a afecções oculares e danos hepatobiliares (WGO, 2015).

As DII em atividade e sem tratamento podem evoluir para complicações intestinais e extra intestinais graves. Dentre as principais complicações intestinais das DII estão hemorragias, perfurações intestinais, abscessos, estenoses e fístulas (ISRAELI et al., 2014). Existem também risco aumentado de neoplasias em pacientes com DII não tratada. Tanto na DC como na RCU sem tratamento há risco significativo de evolução para câncer colorretal e na DC já foi descrito evolução para Adenocarcinoma de intestino delgado (NGUYEN; BRESSLER, 2012).

As complicações extra intestinais das DII ocorrem em cerca de 25% dos pacientes podendo causar complicações hepatobiliares, complicações oculares, artropatias induzidas por drogas, insuficiência renal medicamentosa, anemias carenciais, tromboembolismos, citopenia medicamentosa (tiopurinas) transtornos de ansiedade e complicações ósseas (WGO, 2015).

2.6 DIAGNÓSTICO DE DII E DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Os exames de endoscopia digestiva alta e ileocolonosopia são os procedimentos escolhidos para diagnóstico das DII. O histopatológico pode facilitar a identificação entre DC e RCU, porém, eventualmente podem ocorrer divergências entre os achados histológicos e endoscópicos (VELOSO, 2011). Além destes, também são utilizados para diagnóstico das DII, exames de imagem como colangiopancreatografia de ressonância magnética (CPRM), Imagenologia transversa

(Tomografia Computadorizada), Radiografia de tórax para exclusão de tuberculose (LONGO; FAUCI, 2015; PAPACOSTA et al., 2017).

Testes de laboratório também auxiliam o diagnóstico das DII. Culturas e parasitológico de fezes são utilizados para excluir diarreias de causas bacterianas, virais ou parasitárias. Pesquisa de Lactoferrina e alfa1 antitripsina para avaliar inflamação e dosagem de Calprotectina fecal, teste amplamente utilizado para medir atividade das DII, obtendo melhores resultados em RCU (LIN et al., 2014).

Quanto aos testes sorológicos, os mais utilizados são as dosagens de anticorpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) e anticorpo antineutrofílico perinuclear (p-ANCA). Algumas evidências indicam que a positividade nos exames de dosagem dos anticorpos possa sugerir o fenótipo da doença. A presença do ASCA está correlacionada com o aumento de complicações prematuras na DC. Os testes apresentam baixa sensibilidade e especificidade quando utilizados isoladamente, mas, em conjunto apresentam alta sensibilidade e especificidade (NISIHARA et al., 2010; LONGO; FAUCI, 2015; PAPACOSTA et al., 2017).

Devido à natureza complexa das DII, a falta de um exame único padrão ouro para o seu diagnóstico e a sintomas semelhantes a diversas outras doenças faz-se necessário o diagnóstico diferencial das DII para exclusão de outras enfermidades do diagnóstico. Para isso recorre-se a um conjunto de informações para diferencia-las das DII (PAPACOSTA et al., 2017).

Figura 7 – Diagnóstico diferencial da Retocolite Ulcerativa e Doença de Crohn com outras doenças.

	CU	DC
Principais DDs	<ul style="list-style-type: none"> • Colite aguda autolimitada (CAAL) • Colite amebiana • Esquistossomose • DC • Câncer de cólon • SII (se houver alterações inflamatórias, não é SII) • TBC intestinal • Enteropatia por AINEs 	<ul style="list-style-type: none"> • TBC intestinal • Doença de Behçet • CU • Enteropatia por AINEs • SII • Doença celíaca
Outros DDs	Colite infecciosa, colite isquêmica, colite rádica, púrpura de Henoch-Schönlein, colite colagenosa ou linfocítica, doença de Behçet, colite complicada pelo VIH	Colite isquêmica, colite microscópica, colite rádica, colite por derivação diverticulite crônica e enteropatia induzida por fármaco (por exemplo, AINEs), enterite eosinofílica, linfoma intestinal e câncer de cólon

DC, doença de Crohn; DD, diagnóstico diferencial; VIH, vírus da imunodeficiência humana; SII, síndrome de intestino irritável; AINEs, anti-inflamatórios não esteroides; TBC, tuberculose; CU, colite ulcerativa.

Fonte: World Gastroenterology Organization (2015).

2.7 TRATAMENTOS PARA AS DII

O tratamento das DII é feito a longo prazo e utiliza uma combinação de medicamentos para manejo da doença. Seus principais objetivos são preservação do funcionamento intestinal, melhora na qualidade de vida dos pacientes e prevenir complicações advindas do processo inflamatório crônico. O principal alvo terapêutico dos fármacos utilizados na prática clínica é o controle da resposta imunológica descontrolada visando interromper o processo inflamatório crônico. São utilizados aminossalicilatos, antibióticos, corticosteroides, imunomoduladores, terapia biológica (anticorpos monoclonais) além de tratamentos não farmacológicos baseados na dieta dos pacientes e procedimentos cirúrgicos (SAMUEL et al., 2012; LONGO; FAUCI, 2015; WGO, 2015; PAPACOSTA et al., 2017).

Os aminossalicilatos agem inibindo as enzimas ciclo-oxigenases (COX) modulando o processo inflamatório, porém, possuem uma ação menos efetiva na fase aguda da doença. Os fármacos desta classe mais utilizados para tratamento das DII são: Sulfassalazina, Mesalazina, Olsalazina e Balsalazida, sendo a Mesalazina o representante que apresenta melhor ação protetora contra o desenvolvimento de displasia (BRUNTON et al., 2012; PAPACOSTA et al., 2017; LACERDA, 2018).

Os antibióticos mais utilizados como tratamento coadjuvante para pacientes com DII é a ciprofloxacina e o metronidazol. O uso de antibióticos não pode ser maior que 16 semanas em consequência dos possíveis efeitos sistêmicos ao paciente. Por isso, não se utiliza antibióticos como manejo no tratamento dos portadores de DII (BRUNTON et al., 2012; PAPACOSTA et al., 2017).

Em relação aos corticosteroides, o seu uso em pacientes com DII é muito importante na fase aguda da doença, agindo na redução da inflamação. Porém, deve ser evitado o seu uso nos tratamentos a longo prazo, pois, possuem grande número de efeitos adversos como insuficiência adrenal, desregulação da glicemia, atrofia e fraqueza muscular, osteoporose e aparecimento precoce de cataratas. Os mais utilizados são prednisolona, budesonida e a hidrocortisona (BRUNTON et al., 2012; LOPES, 2017).

A classe mais utilizada nos tratamentos a longo prazo são os imunomoduladores. Os representantes dessa classe que são mais utilizados no tratamento são Azatioprina e o Mercaptopurina. Agem inibindo a síntese de RNA e reduzindo a atividade dos linfócitos T, B e células NK. Possuem ação lenta, podendo ser observado melhora clínica apenas a partir de 14 semanas de uso (BRUNTON et al., 2012; ITAGAKI et al., 2012).

Um imunomodulador bem estudado recentemente para ação em pacientes com DII é o Metotrexato. Foi observado uma ação efetiva em tratamento de fase aguda da DC e na manutenção do tratamento dos pacientes em remissão da doença e nos pacientes que possuem resistência a Azatioprina. São medicamentos seguros para uso na gestação, porém, apresenta efeitos adversos importantes como hepatotoxicidade, imunossupressão e distúrbios gastrointestinais (ROUNTREE et al., 2017; SZETO et al., 2017).

Quanto a terapia biológica, os principais representantes utilizados no Brasil são o Infliximab e o Adalimumab. Este tipo de fármaco é utilizado nos pacientes que não respondem ao tratamento convencional ou desenvolvem efeitos adversos persistentes. São proteínas que agem se ligando ao TNF α , impedindo o estímulo do sistema imunológico, o que impede a formação da inflamação sem causar dano ao tecido saudável. É um tratamento muito eficiente, mas não é indicado para pacientes com infecções associadas. (SOBRADO et al., 2016; PAPACOSTA et al., 2017).

Mais recentemente, foi inserido no tratamento de pacientes com DII outro representante da terapia biológica. O Vedolizumab é um fármaco que inibe a integrina $\alpha 4\beta 7$ bloqueando a passagem dos leucócitos para o intestino, sendo um fármaco de ação seletiva, apresenta menos efeitos adversos, mostrando que esta classe de medicamentos são alvos de pesquisa muito importantes para o tratamento das DII (PAPACOSTA et al., 2017).

2.8 MICRORGANISMOS ASSOCIADOS ÀS DII

Um dos fatores de risco mais importantes na etiologia e patogenia das DII são os microrganismos. Algumas bactérias como *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Clostridium difficile*, fungos como *Saccharomyces cerevisiae*, e vírus como *Citomegalovírus* e *Epstein Barr* têm sido estudados (VAN KRUININGEN et al., 2007; MARTINELLI, 2013; GOMES, 2014; SANTOS, 2016). Também é observado em pacientes com DII, mudança da microbiota natural e resposta imunológica exacerbada contra microrganismos comensais como se fossem patógenos (KUMAR et al., 2010; LONGO; FAUCI, 2015).

As informações sobre o papel dos fungos nas DII são limitadas. Porém, sabe-se que a diversidade fúngica é aumentada em regiões da mucosa intestinal acometidas pelo processo inflamatório. Um recente estudo, mostrou que na região inflamada do intestino de pacientes com DC foi observado o aparecimento de infecções oportunistas por diversos agentes etiológicos, dentre eles, leveduroses causadas por *Candida* spp. (LIN et al., 2014).

É sabido que as células intestinais possuem receptores denominado de dectina 1. Estes receptores estão envolvidos na resposta imune inata contra os fungos pois identificam a molécula β -1,3-glucano presente na parede celular dos fungos. Portanto, pacientes com deficiência nesse receptor podem ser mais vulneráveis ao aumento da população de fungos no intestino, podendo ocasionar maior susceptibilidade ao processo inflamatório intestinal (ILIEV et al., 2012; SANTOS, 2016).

Além disto, existe comprovação de que o tratamento para DII pode estar relacionado com processo infeccioso por fungos nestes pacientes. Um estudo

identificou 281 casos de infecção fúngica invasiva relacionados com a inibição do TNF- α , dos quais 226 (80%) foram associados com o infliximab, 11 (4%) com adalimumab. Em 98% dos casos os pacientes estavam recebendo pelo menos outro medicamento imunomodulador (corticosteroides, metotrexato ou tiopurinas) durante o curso da infecção (TSIODRAS et al., 2008).

2.8.1 O gênero *Candida* e sua relação com as DII

Leveduras do gênero *Candida* são comensais naturais, encontradas em vários sítios corpóreos em seres humanos como boca, pele e trato gastrointestinal. Algumas espécies de *Candida*, podem causar infecções na pele, membranas ou mucosas e podem se disseminar rapidamente, em indivíduos portadores de Diabetes, pacientes com cateter e imunossuprimidos (KUMAR et al., 2010). A Candidíase não tratada pode se disseminar via corrente sanguínea em pacientes imunossuprimidos ou imunodeficientes podendo causar choque séptico (SIMÕES, 2018).

Alguns estudos mostram que pacientes com DC possuem duas vezes mais leveduras como *C. albicans* no trato gastrointestinal que indivíduos saudáveis (CARRIÈRE, 2014; CAMMAROTA et al., 2015). Esta mudança na microbiota intestinal pode favorecer o crescimento descontrolado da população de leveduras do gênero *Candida*, podendo causar infecções intestinais (HOLD, 2014).

As leveduras possuem estratégias específicas para facilitar a colonização nos tecidos do hospedeiro. A adesão às células do hospedeiro, a morfogênese, a produção de toxinas *killer* e de enzimas hidrolíticas extracelulares bem como a formação de biofilme constitui alguns dos requisitos para o estabelecimento da infecção por leveduras do gênero *Candida* (LACAZ et al., 2002; RAPALA-KOZIK et al., 2015; SHERRY et al., 2017).

2.9 RESISTÊNCIA ANTIFÚNGICA

Os fármacos antifúngicos mais utilizados atualmente, são os derivados poliênicos, os triazólicos e as equinocandinas. O representante dos derivados poliênicos de maior importância na terapia antifúngica é a Anfotericina B. Estes

medicamentos atuam interferindo na porção ergosterol da parede celular fúngica, causando um desequilíbrio eletrolítico na célula, ocasionando sua lise. Os azólicos e triazólicos são representantes fungistáticos de amplo espectro, que atuam inibindo a enzima lanosina-14 α -desmetilase dos fungos, responsável pela síntese do ergosterol. O principal representante desta classe é o Fluconazol que é o fármaco de primeira escolha no tratamento de meningite fúngica por conseguir alcançar alta concentração no líquido cefalorraquidiano (BRUNTON et al., 2012; VIEIRA; DOS SANTOS, 2017).

As equinocandinas são antifúngicos administrados por via intravenosa. São fármacos que possuem ação inibidora do crescimento fúngico através do bloqueio da enzima β -1,3-D-glucanosintase, responsável pela síntese do β -1,3-D-glucano, polímero importante da parede celular dos fungos. A ausência deste polímero na estrutura celular do fungo pode causar sua lise. São fármacos com amplo espectro contra leveduras do gênero *Candida*, possuem poucos efeitos adversos, sendo fármacos eficientes no tratamento de leveduroses causadas por *Candida* (BRUNTON et al., 2012; VIEIRA; DOS SANTOS, 2017).

As falhas na terapia antifúngica podem ocorrer por vários fatores como resistência *in vitro* (intrínseca ou desenvolvida), resistência clínica ou resistência microbiológica. A resistência microbiológica pode ser intrínseca ou adquirida. A intrínseca se dá por resistência inata de determinadas espécies de microrganismos. A adquirida ocorre em microrganismos que sofreram mutação e sobreviventes, após exposição ao antifúngico (MOREIRA et al., 2017; VIEIRA; DOS SANTOS, 2017).

Candida albicans é a espécie mais isolada em pacientes com infecções hospitalares em todo o mundo. Contudo, observa-se um aumento da ocorrência de infecções por outras espécies, que são diferentes na produção de fatores de virulência e na sensibilidade ou resistência aos antifúngicos. Então, a identificação correta do agente etiológico da infecção bem como a avaliação de sua suscetibilidade à terapia antifúngica convencional pode contribuir para um tratamento mais efetivo, provocando a redução das taxas de morbidade e mortalidade de pacientes em nível hospitalar (BARBEDO; SGARBI, 2010).

O uso indiscriminado dos fármacos antifúngicos e terapia empírica que ocasiona resistência dos fungos ao tratamento convencional, além da resistência intrínseca dos microrganismos, portanto, se faz necessário a busca de novas

moléculas candidatas a antifúngicos como forma alternativa de tratamento, a fim de proporcionar aos pacientes, melhor qualidade de vida (MOREIRA et al., 2017).

2.10 NOVAS MOLÉCULAS BIOATIVAS COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

A maioria dos tratamentos químicos antifúngicos é tóxica tanto para células do microrganismo, quanto para células humanas. A droga mais comumente utilizada para tratar micoses sistêmicas e outras infecções fúngicas é a anfotericina B, pois na maior parte dos casos os fungos não respondem bem a outros compostos. Os azóis também são amplamente utilizados, mas estes apenas inibem o crescimento microbiano. Décadas de pesquisa farmacêutica trouxeram grandes melhorias na terapêutica de doenças antifúngicas. Quatro tipos de tratamento estão disponíveis comercialmente para este tipo de infecção: polênios, azóis, equinocandinas e análogos da pirimidina (FARUCK et al., 2016).

Embora os fármacos convencionais usados atualmente na prática clínica sejam eficientes no tratamento das micoses em geral, eles apresentam algumas desvantagens em seu uso, como a necessidade do uso prolongado para garantia da eficácia e altos efeitos tóxicos, além de muitas espécies de fungos adquirirem resistência aos medicamentos (LIMA et al., 2017). Este cenário tem reforçado a pesquisa de novas moléculas candidatas a possíveis antifúngicos. Algumas pesquisas demonstram que outras drogas já utilizadas no tratamento de doenças de etiologia parasitária ou bacteriana podem apresentar ação eficiente também contra fungos (BRILHANTE et al., 2010; CORDEIRO et al., 2011).

2.10.1 Miltefosina

A miltefosina é uma molécula anfipática, possuindo em sua região hidrofóbica uma cadeia alquílica hexadecílica e sua região hidrofílica é constituída por um grupo fosfocolina. Esta molécula é um análogo da fosfocolina que foi desenvolvido a princípio para o tratamento de câncer. Posteriormente, foi observado sua ação efetiva contra alguns parasitas como *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania spp.* sendo aprovado seu uso para o tratamento de leishmaniose a partir de 2002 (DORLO et al., 2012).

Alguns estudos mostram que a miltefosina também possui ação antiparasitária e antimicrobiana efetora contra *Schistosoma*, alguns dermatófitos, fungos filamentosos como *Aspergillus sp*, *Scedosporium sp.*, *Fusarium sp.* e também possui ação contra *Cryptococcus sp.*, *Pythium insidiosum* e *Histoplasma capsulatum var. capsulatum* e *Sporothrix spp.* (WIDMER et al., 2006; TONG et al., 2007; MALAQUIAS, 2013; EL-FAHAM et al., 2017; LORETO et al., 2018).

A miltefosina tem ação penetrando na membrana através de sua região lipídica. Proteínas que possuem maior grau de hidrofobicidade podem favorecer a ação da miltefosina levando a ruptura celular. Sendo assim, a membrana celular se apresenta como sítio de ligação primário deste fármaco (MOREIRA et al., 2017). Outros dois mecanismos de ação propostos da miltefosina são por indução da apoptose por inibição da enzima citocromo c oxidase e inibição da fosfolipase B, que é produzida por diversos fungos, servindo para a sobrevivência dos mesmos (MALAQUIAS, 2013).

Estes mecanismos descritos estão diretamente relacionados com o amplo espectro de ação da miltefosina contra fungos e parasitas, bem como, sua ação antitumoral. Todos os estudos sobre seu mecanismo de ação indicam que este fármaco possui vários locais de ação molecular (DORLO et al., 2012).

Embora estudos prévios da capacidade antifúngica da miltefosina já tenha sido realizado, nenhum estudo avaliou sua ação contra leveduras isoladas de pacientes com infecções fúngicas associadas as Doenças Inflamatórias Intestinais. Levando em consideração este cenário, aliado a altos índices de resistência antifúngica e características intrínsecas dos microrganismos, houve um interesse em avaliar a ação da miltefosina frente as leveduras que foram isoladas de pacientes portadores de DII.

3 METODOLOGIA

3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As biópsias foram obtidas de pacientes atendidos e/ou internados no Serviço de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas/UFPE, de acordo com solicitação médica. Os fragmentos foram encaminhados ao Laboratório de Micologia Médica da UFPE para a realização do diagnóstico laboratorial micológico.

3.2 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE), sob nº 63952217.6.0000.5208 (Anexo I). As amostras de tecido foram obtidas após a anuência do paciente ou responsável legal através de assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

3.3 REALIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO E ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS

Após a obtenção das amostras foram preparadas lâminas com adição de clarificante Hidróxido de potássio (KOH) a 20% e, quando necessário, coradas com Giemsa. Concomitantemente, as amostras clínicas serão semeadas em duplicata na superfície do meio ágar Sabouraud (DIFCO) adicionado de 50 mg/L de cloranfenicol contido em placas de Petri, mantidas à temperatura de 30° C e 37° C por até 15 dias. Após o surgimento das colônias estas foram purificadas e identificadas.

Foram colocados fragmentos da colônia em água destilada esterilizada adicionada de 50 mg/L cloranfenicol. Desta suspensão 0,2mL foram semeados por esgotamento na superfície do meio ágar Sabouraud com antibiótico contido em placas de Petri. Posteriormente, as colônias foram repicadas para tubos de ensaio contendo meio específico, de acordo com o fungo isolado, para posterior identificação. Após serem obtidas culturas puras, estas foram identificadas de acordo com as características macroscópicas, microscópicas e fisiológicas (BARNETT; PAYNE; YARROW, 1990).

3.4 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS UTILIZANDO MALDI – TOF/MS

Os isolados foram submetidos à análise direta por espectrometria de massa (MALDI-TOF; MALDI Autoflex III, BrukerDaltonics, Bremen, Germany), de acordo com Lima-Neto et al. (2014).

O cultivo e manutenção dos isolados de *Candida* ocorreram em meio Dextrose Peptona Extrato de Levedura (YEPD). Incubações foram padronizadas em 24hs e as linhagens se desenvolveram aerobicamente a 35°C. Todas as culturas foram analisadas antes do uso quanto à pureza e foram novamente repicadas pelo menos uma vez antes da análise pelo MALDI-TOF MS.

Fragmentos de células (cerca de 50 µg) foram diretamente transferidos do meio de cultura para os 48 anéis da placa. Imediatamente, foi adicionado sobre todas as amostras de leveduras 0,5 µL de ácido fórmico a 25% e misturado levemente com o material biológico. Após a total evaporação do meio líquido, foi adicionado 0,5 µL da solução matrix (75 mg/mL de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico [CHCA] em etanol/água/acetonitrila [1:1:1] com 0,03% de ácido trifluoroacético [TFA] sendo levemente misturado. Cada amostra foi transferida em duplicata para se testar a reprodutibilidade. Durante as análises todas as soluções foram preparadas e estocadas a +5 °C (VAN VEEN; CLAAS; KUIJPER, 2010).

Os espectros para determinação do perfil protéico dos isolados foram obtidos através do laser Nd: YAG (neodymium-dopedyttriumaluminiumgarnet; Nd: Y3Al5O12) de 1064nm, onde a intensidade do laser foi ajustada ligeiramente acima do limiar para a produção de íons. Um kit protéico (proteincalibrationstandart I, BrukerDaltonics, Bilerica, MA, USA) com conhecidos valores de massa das proteínas, foi utilizado para calibração.

A variação de massa entre 2.000 a 20.000 Da foi registrada usando modo linear com pulso de 104 ns em uma voltagem de +20 kV. Espectros finais foram gerados através da soma de 20 tiros de laser acumulados por perfil e 50 perfis produzidos por amostra, levando a um total de 10.800 disparos de laser somados por espectro. A lista de picos obtidos foi exportada ao software Biotyper™ (Biotyper system, versão 3.0) onde as identificações finais foram alcançadas. As identificações através do software

Biotyper™ foram baseadas apenas na presença ou ausência de cada pico no espectro.

3.5 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POR BIOLOGIA MOLECULAR

A identificação molecular dos isolados foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Micologia da UFPE utilizando massa celular da cultura com dois dias de crescimento em meio ágar Sabouraud, posteriormente células foram transferidas para microtubo de extração contendo tampão de lise CTAB 2%. O tubo foi agitado a velocidade de 5,5 m/s por 40 s para lise mecânica das células. Em seguida, o microtubo foi incubado em banho-maria a 65° C por 40 min e centrifugado a 13.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo e adicionado igual volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v) ao sobrenadante recuperado, homogeneizado e centrifugado novamente por 10 min. Novamente o sobrenadante foi transferido para outro microtubo e adicionado volume igual de isopropanol gelado ao sobrenadante recuperado e mantido a -20°C por 1 h. Em seguida o microtubo foi centrifugado por 10 min. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70% e acrescentados de água Ultrapura.

A reação de PCR para amplificação do rDNA foi realizada em volume total de 50 µL, utilizando tampão da Taq DNA polimerase 1X, 1,5 mM de MgCl₂; 0,4 µM de cada primer NL1 e NL4, 0,2 mM de dNTPs, e 0,2 U de Taq DNA polimerase e 25 ng de DNA e a amplificação foi conduzida em termociclador programado para uma desnaturação inicial de 95°C, seguida de 30 ciclos de desnaturação 95°C; anelamento a 62°C; extensão a 72°C e extensão final a 72°C. O produto da PCR (fragmento de aproximadamente 950 pb) foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% a 4V.cm⁻¹, em tampão de corrida TAE 1X (pH 8,0), corado com *GelRed*™ e o produto de amplificação foi purificado com GeneJet™ – PCR Purification Kit – Fermentas e foi sequenciado no Laboratório Central da UFPE.

Os eletroferogramas foram editados utilizando o software Staden package para obtenção manual da sequência consenso. Após a edição, a sequência obtida foi utilizada para busca das mais similares depositadas no GenBank, utilizando a ferramenta BLASTn.

3.6 CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE BIOFILME UTILIZANDO CRISTAL VIOLETA

A avaliação da capacidade de formação de biofilme foi realizada utilizando o método de Melo et al. (2011). As leveduras foram semeadas em meio de cultura ágar Sabouraud dextrose por 24h a 35°C. Após o crescimento, o inóculo foi padronizado em 3 mL de salina, com a turbidez na escala 4 de Mac Farland (10^6 células). 20µL da suspensão foi aliqotado para cada poço da placa de poliestireno de 96 poços, em triplicata, contendo 180µL de caldo Sabouraud suplementado com 8% de glicose. Após 24h de incubação, o excesso de meio de cultura foi removido com pipeta Pasteur. O biofilme foi lavado duas vezes com 200µL de tampão fosfato salina (PBS) para remover as células planctônicas. Após a remoção, as placas foram secas por 20 min a 35°C. Depois, 110µL de cristal violeta a 0,4% foi adicionado aos poços por 45 min. As placas foram lavadas três vezes com 200µL de água ultrapura esterilizada.

Para descoloração foi utilizado 200µL de etanol (95%) por 45 min. Depois, 100µL da solução foi transferida para uma nova placa e o biofilme lido por absorbância em leitor de microplaca no comprimento de onda de 570nm. O controle negativo foi representado pela leitura do biofilme sem o uso do cristal violeta. A quantificação do biofilme foi realizada em triplicata e o desvio padrão para cada isolado foi determinado.

3.7 TESTES DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO*

Os isolados clínicos de *Candida* obtidos a partir das biópsias foram mantidos em meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA) e incubados a 35°C. As suspensões dos isolados foram preparadas em solução salina, e sua densidade foi ajustada de acordo com a escala 0.5 de MacFarland em 90% da transmitância utilizando um espectrofotômetro a 530 nm. O volume do inóculo foi ajustado para 5,0 mL de solução salina esterilizada e, posteriormente, diluído em RPMI 1640 para uma concentração de $2-5 \times 10^3$ céls.mL⁻¹. Para os testes de sensibilidade, foram utilizadas placas de microtitulação planas de 96 poços (TPP; Trasadingen, Suíça). O inóculo foi adicionado aos poços com as drogas utilizadas, e as placas foram incubadas a 35 °C durante 48 horas para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) segundo protocolo padronizado pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* CLSI (2008). Para determinar

a Concentração Fungicida Mínima (CFM) das drogas, o conteúdo dos poços que mostraram 100% de inibição no crescimento foi cultivado para o meio SDA em placas de Petri. As placas foram incubadas a 35°C durante três dias para determinar a viabilidade fúngica. A CFM foi confirmada pela ausência de crescimento fúngico.

3.8 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

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

Após a microtomia dos blocos de parafina, os cortes histológicos obtidos (4 µm) foram desparafinizados, hidratados e submetidos as técnicas de coloração: hematoxilina-eosina (HE), tricrômico de Masson (TM), ácido periódico de Shiff (PAS) e azul de alcian (AB). Posteriormente, as lâminas foram desidratadas em etanol 95%, diafanizadas em xilol e montadas com lamínula e Entellan®.

3.9 ESTUDO IMUNOQUIMIOLUMINESCENTE

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

A quantidade de proteína das alíquotas foi determinada por avaliação da densidade óptica, através da leitura da absorbância na faixa de 280 nm, em

espectrofotômetro modelo *Ultrospec 2100 pro* (Amersham Biosences, USA). Sendo considerada as alíquotas com valores superiores a 50 nm. Após a detecção dos picos, foi realizado um pool de proteínas com as frações conjugadas e realizada a dosagem de proteína através do método de Lowry (CAMPOS; GUILLEN; REYES, 2011).

A quimioluminescência do conjugado presente nas amostras foi mensurada pelo luminômetro tubo único módulo 9200-001 (Turner BioSystems, USA). Para desencadeamento da quimioluminescência é necessária a adição sequencial de 50 μL de uma solução 0,5% H_2O_2 e 0,1 N de ácido nítrico (solução A) a 50 μL de amostra seguida de alcalinização rápida do meio a partir da adição de 50 μL de NaOH a 0,25 N (solução B). A rápida conversão de derivados de acridina em suas pseudobases após a alcalinização requer cuidado para minimizar o tempo entre a adição do NaOH e a observação da intensidade da emissão de quimioluminescência medida em unidade de luz relativa (ULR).

Para a análise dos tecidos, as lâminas histológicas ($0,3 \times 0,3 \times 8 \times 10^{-4}$ cm) foram incubadas com 100 μL do anticorpo conjugado ao EA durante 2 horas a 4° C, posteriormente foram lavadas em PBS (20 mergulhos durante 5 minutos) e imersas em PBS por mais 5 minutos. Após a lavagem a amostra tecidual foi transferida para tubo de polipropileno (1,5 mL) com 100 μL de PBS. O estudo foi realizado em triplicata e os valores de ULR dos tecidos marcados foram determinados através do luminômetro, seguindo o mesmo protocolo utilizado na conjugação do anticorpo ao EA descrito anteriormente.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As médias foram comparadas utilizando teste t-Student e o nível de significância considerado para os valores de p foi <0.05 para avaliação da capacidade de produção de biofilme. Para os valores de detecção de calprotectina e ADAM10 as médias foram avaliadas utilizando teste de Tukey para avaliação da significância com valor de $p <0.05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ARTIGO 1 – PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE PACIENTES PORTADORES DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS ATENDIDOS NO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DE PERNAMBUCO HC – UFPE.

Perfil epidemiológico de pacientes portadores de Doenças Inflamatórias Intestinais atendidos no Hospital das Clínicas de Pernambuco HC – UFPE.

Anthony Alves dos Santos Júnior^a, Valéria Ferreira Martinelli Rocha^b, Humberto Gonçalves Bertão^c, Rejane Pereira Neves^d, Mário Ribeiro de Melo Júnior^{c*}.

^aLaboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

^bHospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

^cDepartamento de Patologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

^dDepartamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

*Autor para correspondência: mariormj@gmail.com

Resumo

Introdução: As Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) são condições inflamatórias crônicas e idiopáticas, representadas por duas comorbidades: a Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RCU). No Brasil os estudos destas doenças ainda são pouco descritos.

Objetivo: Realizar um estudo do perfil epidemiológico de pacientes portadores de DII tratados no Hospital das Clínicas de Pernambuco HC – UFPE.

Métodos: Um estudo observacional transversal descritivo foi realizado por meio de entrevistas com os pacientes atendidos no hospital.

Resultados: 129 pacientes foram incluídos no estudo, dentre eles: 46 (35,65%) do sexo masculino e 83 (64,34%) do sexo feminino, sendo 34,10% dos casos de DC, 63,56% de RCU e 2,32% de colite indeterminada. A média de idade dos pacientes acometidos foi de 25,8 anos. A Mesorregião Metropolitana do Recife apresentou-se

como a principal zona residencial dos pacientes, com 59% dos casos. O principal fármaco utilizado para o tratamento das DII foi a Mesalazina, com 29,45% dos casos. Foi observado também que 16,27% dos pacientes eram portadores de hipertensão arterial e/ou diabetes. Em relação ao tabagismo, 20,92% declararam-se fumantes ou ex-fumantes.

Conclusão: O perfil epidemiológico dos pacientes foi similar ao encontrado em outros estudos já descritos na literatura, com predominância de RCU e maior acometimento de mulheres. Este é o primeiro relato de um estudo epidemiológico de DII no estado de Pernambuco.

Palavras-Chave: Doença de Crohn; Epidemiologia; Retocolite Ulcerativa; Pernambuco.

1. Introdução

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são doenças crônicas induzidas por um desequilíbrio entre a inflamação e as respostas imunes regulatórias, bem como a presença de ulcerações no ambiente gastrointestinal.¹ Os sintomas patológicos associados às DII incluem diarreia sanguinolenta, distúrbios na motilidade intestinal e encurtamento do cólon. As duas principais manifestações das DII são a Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RCU). A DC pode ocorrer em qualquer parte do trato gastrointestinal, da boca ao ânus, enquanto a RCU é observada apenas no cólon e reto.²

Estudos recentes observaram uma prevalência de DII em pacientes da raça branca, com picos entre 20 e 40 anos de idade e um segundo pico após os 55 anos de idade.³ Embora a patogênese das DII não tenha sido claramente elucidada, os trabalhos apontam que fatores ambientais, genéticos e imunológicos estão provavelmente envolvidos no desenvolvimento destas doenças.⁴

A incidência das DII varia em diferentes áreas geográficas, porém é mais comum na América do Norte, norte da Europa e Austrália. No entanto, a incidência mundial está aumentando e se tornando mais comum em regiões como África, América do Sul e Ásia, onde a prevalência era baixa historicamente, indicando seu surgimento como doença global. Na América do Norte os números de pacientes acometidos variam entre 2,2 e 14,3 casos por 100mil habitantes/ano para RCU e de

3,1 a 14,6 casos por 100 mil habitantes/ano para DC. Na Europa a prevalência oscila entre 1,5 e 20,3 casos por 100 mil habitantes/ano para a RCU, bem como 0,7 a 9,8 casos/100 mil habitantes/ano para DC.⁵ Na América do Sul, a incidência de DC atingiu uma média de 1 a 3 casos por 100 mil pessoas, elevando-se a 3–4/100.000 nas áreas urbanas mais desenvolvidas do Brasil.⁶

O Brasil ainda é considerado uma área de baixa prevalência de DII, embora já tenham sido relatados aumentos na frequência de consultas laboratoriais e hospitalizações.^{7,8,9} No país, essas doenças não são consideradas de notificação compulsória, o que leva a crer que provavelmente são subdiagnosticadas.¹⁰ Estudos que abordam o conhecimento do perfil epidemiológico fornecem uma base mais ampla e robusta em elementos a fim de elucidar a história natural da doença, suas principais complicações e falhas terapêuticas, auxiliando no tratamento clínico e terapêutico dos pacientes.

2. Objetivo

Analisar o perfil epidemiológico dos pacientes com doença inflamatória intestinal tratados no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE), levando em consideração os aspectos: gênero, idade, tipo de doença, zona residencial, associação com hipertensão, diabetes e tabagismo e tipo de tratamento.

3. Métodos

Trata-se de um estudo observacional transversal descritivo, realizado no período de agosto de 2015 a agosto de 2017, no setor de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFPE, um serviço de referência em doenças inflamatórias intestinais. A população do estudo envolveu todos os pacientes com DII: doença de Crohn, retocolite ulcerativa e colite indeterminada, observada, registrada e acompanhada no referente setor, com um total de 129 pacientes.

As fichas clínicas dos pacientes foram elaboradas pelos autores deste trabalho e as informações foram adquiridas através de entrevistas com os pacientes com garantia de total confidencialidade em relação aos dados pessoais e informações clínicas. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Pernambuco (CCS-UFPE) e registrado sob o número de dois protocolos: 33667414.8.0000.5208 e 63952217.6.0000.5208. Todos

os pacientes entrevistados foram informados sobre os objetivos do estudo e assinaram um (1) exemplar do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE.

4. Resultados

Durante o período avaliado 129 pacientes atendidos no setor de Gastroenterologia do hospital das clínicas da UFPE foram incluídos neste estudo. Do total de pacientes atendidos, 46 (35,65%) eram do sexo masculino e 83 (64,34%) eram do sexo feminino. Dentro do total de casos, 44 (34,10%) pacientes apresentaram DC, 82 (63,56%) apresentaram RCU e 3 (2,32%) apresentaram colite indeterminada.

A faixa de idade mais acometida pelas DII entre os pacientes do estudo foi de 46-65 anos (36,43%), seguido da faixa etária entre 36-45 anos (27,90%). Ambas as faixas etárias entre 26-35 anos e maiores de 65 anos apresentaram ocorrência de 11,62%, e a faixa etária entre 18-25 foi observada em 12,4% dos entrevistados.

Na figura 1 é possível observar as zonas de residência dos pacientes avaliados através da subdivisão das mesorregiões do estado de Pernambuco. Um total de 76 pacientes eram provenientes da Mesorregião Metropolitana do Recife, com destaque para as cidades de Recife e Jaboatão dos Guararapes; 13 da Mesorregião do Agreste com destaque para as cidades de Bonito e Limoeiro; 10 residiam na Mesorregião do Sertão Pernambucano; 4 na Mesorregião do São Francisco, provenientes das cidades de Petrolina, Petrolândia e Jatobá; e 26 residiam na Mesorregião da Zona da Mata Pernambucana, tendo a cidade de Glória do Goitá em destaque.

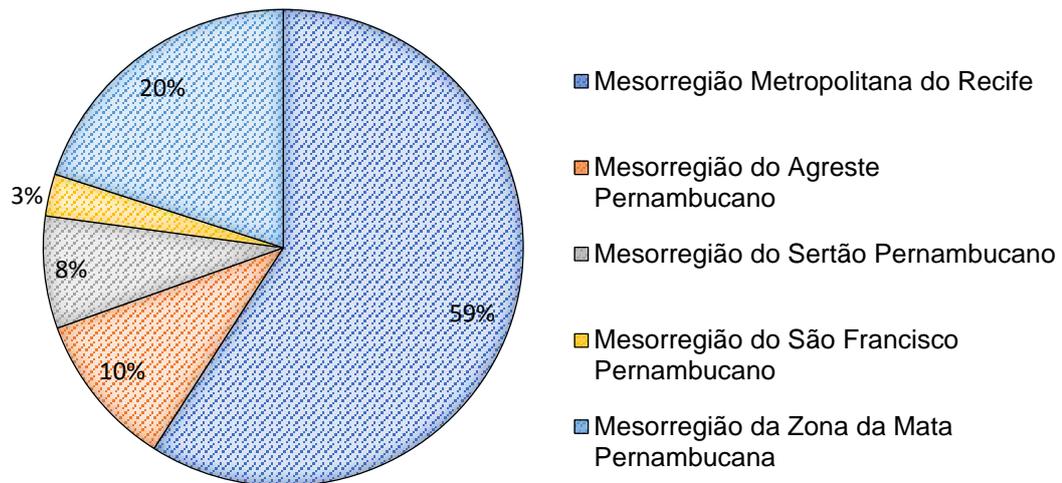


Fig. 1: Zona de residência dos pacientes acometidos com doenças inflamatórias intestinais atendidos no setor de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFPE no período de agosto de 2015 a agosto de 2017.

Em relação às medicações utilizadas no tratamento, 29,45% dos pacientes faziam uso de Mesalazina, 9,30% utilizavam Azatioprina e 8,52% utilizavam Sulfassalazina. No que diz respeito ao Infliximabe e Adalimumabe, 1,55% dos pacientes faziam uso de cada um destes fármacos, respectivamente. Do total, 31,78% dos pacientes utilizavam terapia combinada e 17,82% não estavam fazendo uso de nenhuma medicação.

Correlacionando a ocorrência de doenças crônicas e tabagismo com as DII foi observado que 5,42% pacientes eram portadores de hipertensão arterial sistêmica (HAS), 4,65% eram portadores de diabetes e 6,20% apresentavam as duas doenças. Porém, a maior parte, 83,72%, não eram portadores destas doenças. Em relação ao tabagismo, 4,65% dos pacientes eram fumantes, 16,27% dos pacientes eram ex fumantes e a maior parte dos entrevistados (79,06%) eram não fumantes.

5. Discussão

Os dados obtidos em nosso estudo são similares a alguns trabalhos encontrados na literatura, apontando uma maior prevalência de DII em pacientes acometidos do sexo feminino.^{8,9} Entretanto, até o presente momento a causa desta possível maior susceptibilidade feminina ainda não está bem elucidada.

A idade média dos pacientes acometidos foi de 25,8 anos (DP = 14,85). É interessante ressaltar que 32,55% dos pacientes pertenciam à faixa etária de 20 – 40

anos de idade e 37,20% possuíam faixa etária a partir dos 50 anos de idade. Esses resultados são similares aos picos das doenças descritos na literatura.³ No caso da DC, a literatura reporta uma maior incidência entre a segunda e terceira década de vida.¹¹ Dentre os entrevistados, 82 pacientes possuíam RCU, que de acordo com estudos anteriores é a doença mais prevalente entre as DII.^{7,12,13}

O grupo de pacientes medicados com mesalazina e azatioprina constituiu a maioria nas duas doenças avaliadas. Esses dados corroboram com o perfil terapêutico de trabalhos previamente reportados.⁸ Normalmente o tratamento de escolha para a RCU é feito através de aminossalicilatos, utilizados isoladamente ou combinados com corticoesteróides.^{14,15} Em pacientes com DC, embora a mesalazina oral tenha se mostrado benéfica no passado, novas evidências sugerem que essa terapia é minimamente eficaz quando comparada a placebo, e menos eficaz do que corticosteroides convencionais.¹⁶ Um estudo descrito na literatura avaliou a dosagem convencional de mesalazina (3,2 - 4 g/dia) administrada em pacientes com doença ileal, íleo-colônica ou colônica, e foi observada uma significativa, mas não clinicamente relevante, diferença estatística em relação ao placebo.¹⁶ No entanto, ainda é possível observar que muitos pacientes que sofrem com DII fazem uso desde fármaco, uma terapia sem eficácia consistente.

Uma pequena parcela dos pacientes entrevistados (16,27%) relatou a ocorrência de DII associada a doenças crônicas como diabetes e/ou HAS. A prevalência de DII em indivíduos acometidos com doenças que integram a síndrome metabólica (SM) (obesidade, resistência à insulina, hipertensão e dislipidemia) ainda não está bem estabelecida, mas alguns estudos demonstram que a presença da SM aumenta a taxa de hospitalização em pacientes com a doença de Crohn.¹⁷ Embora diferentes em suas origens e apresentações, a SM e a DII compartilham algumas questões fisiopatológicas, incluindo desregulação do tecido adiposo, resposta imunológica inadequada e inflamação. Além disso, alguns autores já sugerem a possível utilização de fármacos destinados ao tratamento da SM como adjuvantes na terapia contra DII.¹⁸

Um total de 20 pacientes (20,92%) declararam-se fumantes ou ex-fumantes, um percentual similar (21,0%) ao encontrado por outros autores.⁷ Apesar de múltiplos fatores ambientais estarem relacionados ao possível desencadeamento das DII, o tabagismo continua a ser o mais independente fator de risco estabelecido.¹⁹ Estudos relatam que a exposição ao tabaco tem um efeito prejudicial significativo no curso da

doença, manifestando-se com aumento do risco de recaída, necessidade de associação com esteroides e aumento em dobro da taxa de hospitalização.²⁰

6. Conclusão

Em conclusão, os resultados desse estudo demonstraram uma prevalência de DII em mulheres, com uma idade média de 25,8 anos. Entre as doenças avaliadas a maior ocorrência foi de retocolite ulcerativa, e a mesalazina apresentou-se como o principal fármaco utilizado na terapêutica. Uma pequena parcela dos pacientes acometidos relatou a ocorrência de DII associada à diabetes e/ou hipertensão, e um quantitativo menor dos entrevistados também se declarou fumante ou ex-fumante. Estudos epidemiológicos sobre DII no Brasil ainda são bastante escassos, e até o presente momento nenhum trabalho avaliando o perfil epidemiológico dos pacientes com DII em Pernambuco tinha sido realizado. Esses achados ratificam a importância de estudos desse gênero para uma maior compreensão e distribuição da doença no país.

7. Referências

1. Ji KY, Jang JH, Lee EH, Kim SM, Song HW, Yang WK, Ki HY, Kim KH, Lee YS, Kim DS, Kang HS, Kim SH. *Canavalia gladiata* and *Arctium lappa* extracts ameliorate dextran sulphate sodium-induced inflammatory bowel disease by enhancing immune responses. *J Funct Foods*. 2015; 45: 24–33.
2. Huijbregtse I L, Van Lent A U, Van Deventer S J. Immunopathogenesis of IBD: Insufficient suppressor function in the gut? *Gut*. 2007; 56: 584–92.
3. Souza MM, Belasco AGS, Aguilar-Nascimento JE. The epidemiological profile of patients with inflammatory bowel disease in the State of Mato Grosso. *Rev Bras Coloproct*. 2008;28:324–8.
4. Kaser A, Zeissig S, Blumberg R S. Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol*. 2010; 28, 573–621.

5. Longo DL, Fauci AS. *Gastroenterologia e Hepatologia de Harrison*. 2a Ed. Porto Alegre. AMGH Editora, 2015.
6. Victoria CR, Sassak LY, Nunes HRC. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of São Paulo State, Brazil. *Arq Gastroenterol*. 2009; 46: 20–5.
7. Parente JML, Coy CSR, Campelo V, Parente MPPD, Costa LA, Silva RM, Stephan C, Zeitune JMR. Inflammatory bowel disease in an underdeveloped region of Northeastern Brazil. *World J Gastroenterol*. 2015; 28; 21(4): 1197-1206.
8. Arantes JAV, Santos CHM, Delfino BM, Silva BA, Souza RMM, Souza TMM, Flávio ID, Ferreira CG, Cruz SBG. Epidemiological profile and clinical characteristics of patients with intestinal inflammatory disease. *J Coloproctol (Rio J)*. 2017; 37(4):273–8.
9. Barros PAC, Silva AMR, Lins Neto MADF. The epidemiological profile of inflammatory bowel disease patients on biologic therapy at a public hospital in Alagoas. *J. Coloproctol (Rio J)*. 2014; 34(3):131–5.
10. Souza MM, Belasco AGS, Aguilar-Nascimento JE. Perfil Epidemiológico dos Pacientes Portadores de Doença Inflamatória Intestinal do Estado de Mato Grosso. *Rev Bras Coloproct*. 2008;28:324–8.
11. World Gastroenterology Organisation Practice Guidelines. Doença Inflamatória Intestinal: uma perspectiva global – 2009. Disponível em: <http://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/inflammatory-bowel-disease-portuguese-2009.pdf>
12. Torres JAP, Santana RM, Torres FAP, Moura AR, Torres Neto JR. Doenças inflamatórias intestinais no Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe: manifestações extraintestinais. *Rev Bras Coloproct*. 2011;31:115–9.

13. Park KT, Bass D. Inflammatory bowel disease-attributable costs and cost-effective strategies in the United States: a review. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17:1603–9.
14. Kleinubing-Júnior H, Pinho MSL, Ferreira LC, Bachtold GA, Merki A. Perfil dos pacientes ambulatoriais com doenças inflamatórias intestinais. *ABCD: Arq Bras Cir Dig*. 2011;24:200–3.
15. Strong S, Steele SR, Boutrous M, Bordineau L, Chun J, Stewart, DB. Clinical practice guidelines committee of the American Society of Colon and Rectal Surgeons. Clinical Practice Guidelines for the Surgical Management of Crohn's Disease. *Dis Colon Rectum*. 2015;58:1021–36.
16. Lichtenstein GR, Hanauer SB, Sandborn WJ, The Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. Management of Crohn's Disease in Adults. *Am J Gastroenterol*. 2009; 104:465–83.
17. Fitzmorris PS, Colantonio LD, Torrazza Perez E, Smith I, Kakati DD, Malik TA. Impact of metabolic syndrome on the hospitalization rate of Crohn's disease patients seen at a tertiary care center: a retrospective cohort study. *Digestion* 2015;91:257–62.
18. Michalak A, Mosinska A, Fichna J. Common links between metabolic syndrome and inflammatory bowel disease: Current overview and future perspectives. *Pharmacol Rep*. 2016; 68: 837–846.
19. Domènech E, Mañosa M, Lobatón T, Cabré E. Optimizing post-operative Crohn's disease treatment. *Ann Gastroenterol*. 2014;27(4):313–39.
20. Cabré E, Domènech E. Impact of environmental and dietary factors on the course of in- flammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2012;18(29): 3814–22.

4.2 ARTIGO 2 – DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL ASSOCIADA À INFECÇÃO POR *CANDIDA*: ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA, DETECÇÃO QUIMIOLUMINESCENTE E PERFIL DE SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS

Doença inflamatória intestinal associada à infecção por *Candida*: análise histopatológica, detecção quimioluminescente e perfil de sensibilidade a antifúngicos

Anthony Alves dos Santos Junior¹, Ana Paula Fernandes da Silva¹, Cícero Pinheiro Inácio², Sylvania Tavares Paz³, Humberto Gonçalves Bertão³, Reginaldo Gonçalves de Lima Neto⁴, Rejane Pereira Neves⁵, Mário Ribeiro de Melo Junior⁶

¹Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde – PPGBAS

²Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos – PPGBF

³Programa de Pós-graduação em Patologia - POSPAT

⁴Departamento de Medicina Tropical/UFPE

⁵Departamento de Micologia/UFPE

⁶Departamento de Patologia/UFPE

RESUMO:

A doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RCU) são doenças inflamatórias crônicas do trato gastrointestinal de etiologia idiopática. Há evidências de que os microrganismos estão diretamente envolvidos com a fisiopatologia das doenças inflamatórias intestinais. O objetivo do presente estudo foi verificar a ocorrência de candidíase em pacientes portadores de DII, bem como, identificar as leveduras obtidas, avaliar a capacidade de produção de biofilme e determinar seu perfil de sensibilidade a drogas antifúngicas e à miltefosina, avaliar histopatologicamente os tecidos das biópsias e detectar a presença de calprotectina e ADAM10 nos tecidos. Foram avaliados 63 pacientes portadores de DC e RCU do Hospital das Clínicas da UFPE. Dentre eles, 5 pacientes apresentaram candidíase associada. As cepas foram identificadas sendo: duas de *Candida albicans*, duas de *C. glabrata* e uma cepa de *C. lusitaniae* e todas demonstraram capacidade de produção de biofilme similar à uma cepa padrão. Quanto ao perfil de sensibilidade das

cepas frente aos antifúngicos convencionais e à miltefosina, os microrganismos apresentaram concentrações inibitórias mínimas para a miltefosina menores ou iguais às da Anfotericina B. Também foi observado sensibilidade dos isolados frente às equinocandinas. As cepas de *C. glabrata* apresentaram resistência à caspofungina. Forem observadas alterações histopatológicas nos tecidos, destacando a presença de irregularidades nas criptas de Lieberkhun e infiltrado inflamatório. Altas expressões de calprotectina e ADAM10 foram observadas nas amostras teciduais. Estes resultados ajudam a solidificar a associação das DII com infecções microbianas, igualmente ratificam a calprotectina como importante biomarcador de DC e RCU. Além disso, sugerem a ADAM10 como potencial biomarcador de doenças do sistema digestório, em especial, as doenças inflamatórias intestinais.

Palavras-Chave: *Candida*; Doenças Inflamatórias Intestinais; Imunoquimioluminescencia; Miltefosina.

1. Introdução

A doença inflamatória intestinal (DII) compreende um conjunto inflamatório idiopático crônico de condições que podem afetar todo o trato gastrointestinal. A DII consiste em duas principais formas clinicamente definidas: doença de Crohn (DC) e retocolite ulcerativa (RCU). A DC geralmente envolve o íleo e o cólon, mas pode afetar qualquer região do trato gastrointestinal de forma descontínua, e a inflamação é frequentemente transmural. Em contrapartida, a RCU está delimitada ao intestino grosso, estendendo-se proximalmente a partir do reto para potencialmente envolver todo o cólon em um padrão ininterrupto, com extensa ulceração superficial da mucosa [1]. A DII está associada com alta morbidade e diminuição da qualidade de vida, e sua incidência está aumentando em todo o mundo, ganhando um destaque substancial na saúde pública [2-4].

Ambas manifestações são caracterizadas por períodos alternados de remissão e recaída. A recaída é caracterizada pela incidência de espasmos abdominais, sangramento retal, anemia, febre, fadiga, náusea e perda de peso [5-6]. Até o momento, a etiologia da DII não é completamente compreendida. Vários fatores, incluindo predisposição genética, disfunção imunorregulatória, fatores ambientais e exposição microbiana, contribuem para o desenvolvimento da doença [7-8]. Disbiose

e infecções patogênicas também já foram relatadas na literatura desempenhando um papel na compreensão da enfermidade [7].

Há evidências circunstanciais de que determinados microrganismos estão associados à doença inflamatória intestinal, possivelmente lançando uma resposta inflamatória e, posteriormente, atuando na manutenção dessa resposta através do sistema imunológico. Na literatura já foram descritos microrganismos como bactérias dos gêneros *Campylobacter*, *Salmonella* e *Shigella*, fungos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Aspergillus clavatus*, e *Criptococcus neoformans* e vírus da família Herpesviridae, todos causando infecção associada à DII [8-12]. É interessante notar que a levedura *C. albicans* já foi relatada por ser a espécie fúngica mais abundante em amostras de fezes de pacientes com DC do que em pacientes saudáveis [13].

O tratamento da DII é variado de acordo com o local da doença e atividade. Aminosalicilatos, corticosteróides, agentes do fator de necrose tumoral e drogas imunossupressoras são comumente utilizados durante a recaída aguda ou para a manutenção da remissão [14-15]. No entanto, não há cura para a DII, e as terapias disponíveis não controlam os sintomas em um grande número de pacientes, que possuem por sua vez alguma infecção microbiana associada. Tal conjuntura dá subsídios para se considerar a hipótese de uma associação entre antimicrobianos que possam ser aliados aos medicamentos convencionais utilizados no tratamento da DII, reduzindo a população microbiana local e auxiliando o controle do processo inflamatório.

Sendo assim, novos tratamentos com um mecanismo de ação mais específico direcionado a diferentes alvos terapêuticos devem ser desenvolvidos para o tratamento da DII. A miltefosina (MTF) é uma alquilfosfocolina inicialmente desenvolvida como um agente antitumoral, mas sua atividade anticancerígena mostrou-se limitada. Paralelamente, este composto apresentou potente atividade antiparasitária, particularmente contra *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* [16-17]. Em muitos países da América Latina, Índia, Alemanha, dentre outros, a MTF é frequentemente usada para o tratamento da leishmaniose e do câncer de mama. Além de sua atividade antiparasitária, estudos demonstraram atividades antifúngicas *in vitro* de MTF contra diversos fungos tais como: *Coccidioides posadasii* [18], *Sporothrix* spp. [19], *Fusarium oxysporum* [21] e *Candida albicans* [20-21]

Algumas proteínas presentes no tecido do trato gastrointestinal têm sido estudadas para diagnóstico e manejo do tratamento das DII. A calprotectina já foi observada por estar expressa em maior quantidade em pessoas acometidas com a doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa [22], se mostrando um importante biomarcador e auxiliando na terapêutica dos pacientes. Outras moléculas como a ADAM10, uma desintegrina metaloproteinase, têm sido estudadas com relação ao seu papel na sinalização e homeostase do TGI [23], podendo ser futuramente uma molécula utilizada como marcador biológico das DII.

Embora a atividade antifúngica da MTF tenha sido relatada para muitos fungos, até o presente momento não há relatos do uso deste composto contra espécies provenientes de pacientes com doença inflamatória intestinal. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos antifúngicos *in vitro* da MTF sobre cepas do gênero *Candida* isoladas de biópsias intestinais de pacientes diagnosticados com DII, verificar a capacidade de produção de biofilmes desses isolados, bem como realizar a histopatologia e detectar a presença de ADAM-10 e Calprotectina nos tecidos obtidos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção das amostras

As biópsias foram obtidas de pacientes atendidos e/ou internados no Serviço de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas/UFPE, de acordo com solicitação médica. Os fragmentos foram encaminhados ao Laboratório de Micologia Médica da UFPE para a realização do diagnóstico laboratorial micológico.

2.2 Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE), sob nº 63952217.6.0000.5208 (Anexo I). As amostras de tecido foram obtidas após a anuência do paciente ou responsável legal através de assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

2.3 Realização do diagnóstico e isolamento das leveduras

Após a obtenção das amostras foram preparadas lâminas com adição de clarificante Hidróxido de potássio (KOH) a 20% e, quando necessário, coradas com Giemsa. Concomitantemente, as amostras clínicas serão semeadas em duplicata na superfície do meio ágar Sabouraud (DIFCO) adicionado de 50 mg/L de cloranfenicol contido em placas de Petri, mantidas à temperatura de 30° C e 37° C por até 15 dias. Após o surgimento das colônias estas foram purificadas e identificadas.

Foram colocados fragmentos da colônia em água destilada esterilizada adicionada de 50 mg/L cloranfenicol. Desta suspensão 0,2mL foram semeados por esgotamento na superfície do meio ágar Sabouraud com antibiótico contido em placas de Petri. Posteriormente, as colônias foram repicadas para tubos de ensaio contendo meio específico, de acordo com o fungo isolado, para posterior identificação. Após serem obtidas culturas puras, estas foram identificadas de acordo com as características macroscópicas, microscópicas e fisiológicas [24].

2.4 Identificação dos isolados utilizando MALDI – TOF/MS

Os isolados foram submetidos à análise direta por espectrometria de massa (MALDI-TOF; MALDI Autoflex III, BrukerDaltonics, Bremen, Germany), de acordo com Lima-Neto et al. (2014) [25].

O cultivo e manutenção dos isolados de *Candida* ocorreram em meio Dextrose Peptona Extrato de Levedura (YEPD). Incubações foram padronizadas em 24hs e as linhagens se desenvolveram aerobicamente a 35°C. Todas as culturas foram analisadas antes do uso quanto à pureza e foram novamente repicadas pelo menos uma vez antes da análise pelo MALDI-TOF MS.

Fragmentos de células (cerca de 50 µg) foram diretamente transferidos do meio de cultura para os 48 anéis da placa. Imediatamente, foi adicionado sobre todas as amostras de leveduras 0,5 µL de ácido fórmico a 25% e misturado levemente com o material biológico. Após a total evaporação do meio líquido, foi adicionado 0,5 µL da solução matrix (75 mg/mL de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico [CHCA] em etanol/água/acetonitrila [1:1:1] com 0,03% de ácido trifluoroacético [TFA] sendo levemente misturado. Cada amostra foi transferida em duplicata para se testar a reprodutibilidade. Durante as análises todas as soluções foram preparadas e estocadas a +5 °C [26].

Os espectros para determinação do perfil protéico dos isolados foram obtidos através do laser Nd: YAG (neodymium-doped yttrium aluminium garnet; Nd: Y3Al5O12) de 1064nm, onde a intensidade do laser foi ajustada ligeiramente acima do limiar para a produção de íons. Um kit protéico (protein calibration standart I, Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) com conhecidos valores de massa das proteínas, foi utilizado para calibração.

A variação de massa entre 2.000 a 20.000 Da foi registrada usando modo linear com pulso de 104 ns em uma voltagem de +20 kV. Espectros finais foram gerados através da soma de 20 tiros de laser acumulados por perfil e 50 perfis produzidos por amostra, levando a um total de 10.800 disparos de laser somados por espectro. A lista de picos obtidos foi exportada ao software Biotyper™ (Biotyper system, versão 3.0) onde as identificações finais foram alcançadas. As identificações através do software Biotyper™ foram baseadas apenas na presença ou ausência de cada pico no espectro.

2.5 Identificação dos isolados por biologia molecular

A identificação molecular dos isolados foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Micologia da UFPE utilizando massa celular da cultura com dois dias de crescimento em meio ágar Sabouraud, posteriormente células foram transferidas para microtubo de extração contendo tampão de lise CTAB 2%. O tubo foi agitado a velocidade de 5,5 m/s por 40 s para lise mecânica das células. Em seguida, o microtubo foi incubado em banho-maria a 65° C por 40 min e centrifugado a 13.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo e adicionado igual volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v) ao sobrenadante recuperado, homogeneizado e centrifugado novamente por 10 min. Novamente o sobrenadante foi transferido para outro microtubo e adicionado volume igual de isopropanol gelado ao sobrenadante recuperado e mantido a -20°C por 1 h. Em seguida o microtubo foi centrifugado por 10 min. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70% e acrescentados de água Ultrapura.

A reação de PCR para amplificação do rDNA foi realizada em volume total de 50 µL, utilizando tampão da Taq DNA polimerase 1X, 1,5 mM de MgCl₂; 0,4 µM de cada primer NL1 e NL4, 0,2 mM de dNTPs, e 0,2 U de Taq DNA polimerase e 25 ng

de DNA e a amplificação foi conduzida em termociclador programado para uma desnaturação inicial de 95°C, seguida de 30 ciclos de desnaturação 95°C; anelamento a 62°C; extensão a 72°C e extensão final a 72°C. O produto da PCR (fragmento de aproximadamente 950 pb) foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% a 4V.cm⁻¹, em tampão de corrida TAE 1X (pH 8,0), corado com *Ge/Red*TM e o produto de amplificação foi purificado com GeneJetTM – PCR Purification Kit – Fermentas e foi sequenciado no Laboratório Central da UFPE.

Os eletroferogramas foram editados utilizando o software Staden package para obtenção manual da sequência consenso. Após a edição, a sequência obtida foi utilizada para busca das mais similares depositadas no GenBank, utilizando a ferramenta BLASTn.

2.6 Capacidade de produção de biofilme utilizando cristal violeta

A avaliação da capacidade de formação de biofilme foi realizada utilizando o método de Melo et al (2011) [27]. As leveduras foram semeadas em meio de cultura ágar Sabouraud dextrose por 24h a 35°C. Após o crescimento, o inóculo foi padronizado em 3 mL de salina, com a turbidez na escala 4 de Mac Farland (10⁶ células). 20µL da suspensão foi aliquoteado para cada poço da placa de poliestireno de 96 poços, em triplicata, contendo 180µL de caldo Sabouraud suplementado com 8% de glicose. Após 24h de incubação, o excesso de meio de cultura foi removido com pipeta Pasteur. O biofilme foi lavado duas vezes com 200µL de tampão fosfato salina (PBS) para remover as células planctônicas. Após a remoção, as placas foram secas por 20 min a 35°C. Depois, 110µL de cristal violeta a 0,4% foi adicionado aos poços por 45 min. As placas foram lavadas três vezes com 200µL de água ultrapura esterilizada.

Para descoloração foi utilizado 200µL de etanol (95%) por 45 min. Depois, 100µL da solução foi transferida para uma nova placa e o biofilme lido por absorbância em leitor de microplaca no comprimento de onda de 570nm. O controle negativo foi representado pela leitura do biofilme sem o uso do cristal violeta. A quantificação do biofilme foi realizada em triplicata e o desvio padrão para cada isolado foi determinado.

2.7 Testes de sensibilidade antifúngica *in vitro*

Os isolados clínicos de *Candida* obtidos a partir das biópsias foram mantidos em meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA) e incubados a 35°C. As suspensões dos isolados foram preparadas em solução salina, e sua densidade foi ajustada de acordo com a escala 0.5 de MacFarland em 90% da transmitância utilizando um espectrofotômetro a 530 nm. O volume do inóculo foi ajustado para 5,0 mL de solução salina esterilizada e, posteriormente, diluído em RPMI 1640 para uma concentração de $2-5 \times 10^3$ céls.mL⁻¹. Para os testes de sensibilidade, foram utilizadas placas de microtitulação planas de 96 poços (TPP; Trasadingen, Suíça). O inóculo foi adicionado aos poços com as drogas utilizadas, e as placas foram incubadas a 35 °C durante 48 horas para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) segundo protocolo padronizado pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* CLSI [28]. Para determinar a Concentração Fungicida Mínima (CFM) das drogas, o conteúdo dos poços que mostraram 100% de inibição no crescimento foi cultivado para o meio SDA em placas de Petri. As placas foram incubadas a 35°C durante três dias para determinar a viabilidade fúngica. A CFM foi confirmada pela ausência de crescimento fúngico.

2.8 Estudo histopatológico

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

Após a microtomia dos blocos de parafina, os cortes histológicos obtidos (4 µm) foram desparafinizados, hidratados e submetidos as técnicas de coloração: hematoxilina-eosina (HE), tricrômico de Masson (TM), ácido periódico de Shiff (PAS) e azul de alcian (AB). Posteriormente, as lâminas foram desidratadas em etanol 95%, diafanizadas em xilol e montadas com lamínula e Entellan®.

2.9 Estudo imunoquimioluminescente

A conjugação do éster de acridina (EA) com os anticorpos foi realizada de acordo com o protocolo de conjugação desenvolvido por Weeks et al (1983) e

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

A quantidade de proteína das alíquotas foi determinada por avaliação da densidade óptica, através da leitura da absorbância na faixa de 280 nm, em espectrofotômetro modelo *Ultrospec 2100 pro* (Amersham Biosences, USA). Sendo considerada as alíquotas com valores superiores a 50 nm. Após a detecção dos picos, foi realizado um pool de proteínas com as frações conjugadas e realizada a dosagem de proteína através do método de Lowry [29].

A quimioluminescência do conjugado presente nas amostras foi mensurada pelo luminômetro tubo único módulo 9200-001 (Turner BioSystems, USA). Para desencadeamento da quimioluminescência é necessária a adição sequencial de 50 µL de uma solução 0,5% H₂O₂ e 0,1 N de ácido nítrico (solução A) a 50 µL de amostra seguida de alcalinização rápida do meio a partir da adição de 50µL de NaOH a 0,25 N (solução B). A rápida conversão de derivados de acridina em suas pseudobases após a alcalinização requer cuidado para minimizar o tempo entre a adição do NaOH e a observação da intensidade da emissão de quimioluminescência medida em unidade de luz relativa (ULR).

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

2.10 Análise Estatística

As médias foram comparadas utilizando teste t-Student e o nível de significância considerado para os valores de p foi <0.05 para avaliação da capacidade de produção de biofilme. Para os valores de detecção de calprotectina e ADAM10 as médias foram avaliadas utilizando teste de Tukey para avaliação da significância com valor de $p <0.05$.

3. RESULTADOS

3.1 Identificação dos isolados utilizando MALDI – TOF MS

Foram estudados pacientes atendidos no setor de gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco HC – UFPE (n=63). Destes, cinco pacientes (n=5) apresentaram infecção fúngica associada ao processo inflamatório crônico. Após isolamento e purificação das culturas as mesmas seguiram para identificação proteômica utilizando MALDI – TOF MS. O resultado das identificações, estão descritos na tabela 1.

Tabela 1: Identificação proteômica dos isolados obtidos utilizando MALDI-TOF MS

Número de Registro	Espécie
5A	<i>Candida lusitaniae</i>
22A	<i>Candida glabrata</i>
25A	<i>Candida albicans</i>
27A	<i>Candida albicans</i>
28A	<i>Candida glabrata</i>

3.2 Identificação dos isolados utilizando biologia molecular

Em seguida, para confirmação das identificações, os isolados foram submetidos a identificação utilizando biologia molecular. Os dois isolados de *C. albicans* e os dois isolados de *C. glabrata* foram identificados utilizando primers espécie – específicos para cada uma das espécies. O isolado de *C. lusitaniae* após o processo de PCR (Reação em cadeia da Polimerase) seu material genético foi purificado e enviado para sequenciamento na plataforma de sequenciamento do

Laboratório Central da Universidade Federal de Pernambuco (LABCEN – UFPE). A Tabela 2 mostra o resultado da identificação utilizando biologia molecular.

Tabela 2: Identificação dos isolados obtidos utilizando biologia molecular

Identificação por MALDI – TOF MS	Identificação por biologia molecular
<i>Candida lusitanae</i>	<i>Clavispora lusitanae</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>

3.3 Capacidade de produção de biofilme utilizando cristal violeta

Após o processo de identificação os isolados obtidos, bem como uma cepa padrão (*Candida albicans* ATCC 900928), foram avaliados quanto a sua capacidade para formação de biofilme utilizando o método com cristal violeta. A figura 1 mostra os resultados obtidos. A cepa 27A apresentou capacidade de formação de biofilme semelhante a cepa padrão. A cepa 5A mostrou uma capacidade de produção de biofilme ligeiramente maior que as demais cepas que não diferiram uma da outra.

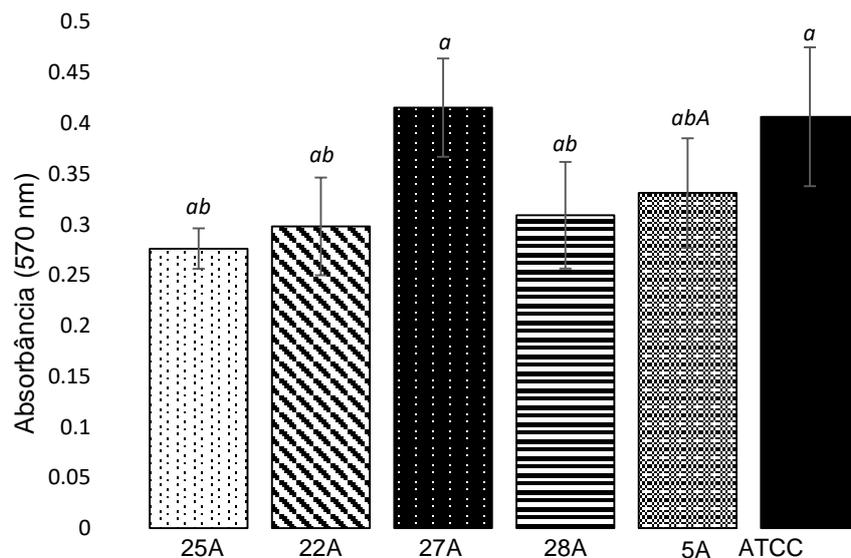


Fig 1: Quantificação do biofilme produzido pelos isolados obtidos utilizando método de cristal violeta. Cepas: *Candida albicans* (25A); *Candida glabrata* (22A); *Candida albicans* (27A); *Candida glabrata* (28A) e *Candida albicans* (ATCC 90028). Os dados foram expressos como média \pm DP. Teste t foi realizado considerando $p < 0.05$.

3.4 Testes de sensibilidade antifúngica *in vitro*

Foi avaliado, também, o perfil de sensibilidade das cepas obtidas frente a MTF e a fármacos antifúngicos utilizados comumente na prática clínica, sendo eles: Anfotericina B, Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol, Caspofungina, Micafungina e Anidulafungina. Os resultados das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM's) estão expressos na Tabela 3.

Os resultados dos testes de sensibilidades realizados com as cepas obtidas mostram uma susceptibilidade maior dos isolados a micafungina. Porém, para a cepa de *C. lusitanae* a CIM foi maior que as outras cepas. Apenas o isolado 28A foi sensível ao itraconazol, enquanto as outras cepas apresentaram CIM's de sensibilidade dose-dependente (tabela 3). O grupo de microrganismos da espécie *C. albicans* se mostrou sensível ao fluconazol e ao voriconazol, enquanto os dois isolados de *C. glabrata* apresentaram sensibilidade dose dependente para fluconazol.

Tabela 3: Concentrações Inibitórias Mínimas dos fármacos antifúngicos e da Miltefosina contra as cepas de *Candida* isolada dos pacientes acometidos com DII

µg/mL	<i>C. albicans</i>			<i>C. glabrata</i>		<i>C. lusitanae</i>
	25A	27A	ATCC	22A	28A	5A
Miltefosina	4.0	2.0	2.0	2.0	4.0	8.0
Anfotericina B	4.0	4.0	2.0	8.0	8.0	8.0
Fluconazol	0.5 ^S	0.5 ^S	0.5 ^S	16.0 ^{SDD}	4.0 ^{SDD}	1.0
Voriconazol	0.062 ^S	0.062 ^S	0.125 ^S	1.0	0.5	0.062
Itraconazol	<0.031 ^{SDD}	<0.031 ^{SDD}	0.5 ^{SDD}	0.5 ^{SDD}	0.125 ^S	0.062
Caspofungina	0.5 ⁱ	0.5 ⁱ	0.125 ^S	2.0 ^R	2.0 ^R	0.25
Micafungina	0.06 ^S	<0.03 ^S	0.06 ^S	<0.03 ^S	0.06 ^S	1.0
Anidulafungina	<0.015 ^S	<0.015 ^S	0.5 ⁱ	0.015 ⁱ	0.031 ⁱ	0.5

^S Sensibilidade; ⁱ Sensibilidade intermediária; ^{SDD} Sensibilidade dose-dependente; ^R Resistência.

Quanto a caspofungina os isolados de *C. albicans* mostraram sensibilidade intermediária e os isolados de *C. glabrata* apresentaram resistência a esta

equinocandina. Em relação a anidulafungina apenas as cepas de *C. albicans* se mostraram sensíveis a esta droga. As CIM's para anfotericina B foram iguais em isolados da mesma espécie. Em relação a miltefosina, as CIM's se apresentaram iguais ou menores em comparação com a anfotericina B.

3.5 Análises histopatológicas das biópsias

O tecido intestinal possui um epitélio simples colunar podendo apresentar células caliciformes, microvilosidades e células de Lieberkühn (glândulas intestinais). Nas fotomicrografias das amostras controles, ou seja, as amostras teciduais de não portadores de doença inflamatória intestinal, observamos: criptas com arquitetura preservada; e a presença de colágeno e glicoproteínas.

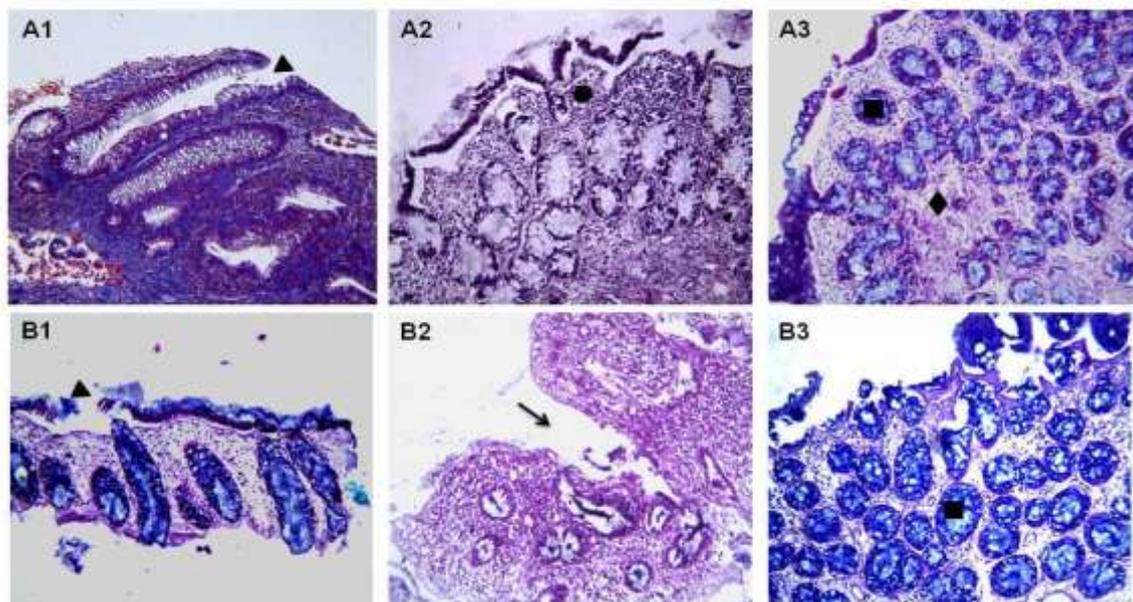


Fig 2: Análise histológica de pacientes portadores de doenças inflamatórias intestinais com infecção por *Candida* associada. (▲): Criptas desorganizadas com superfícies irregulares; (●): Infiltrado inflamatório; (◆): Granuloma; (■): Presença intensa de mucinas e glicoproteínas marcadas em azul; (→): Fissura do tecido epitelial intestinal. (A1): Coloração de Tricrômico de Masson em 400x de magnificação. (A2): Coloração de Hematoxilina-Eosina em 100x de magnificação. (A3): Coloração de Azul de Alcian e Ácido Periódico de Schiff em 400x de magnificação. (B1): Coloração de Azul de Alcian e Ácido Periódico de Schiff em 100x de magnificação. (B2): Coloração de Hematoxilina-Eosina em 100x de magnificação. (B3): Coloração de Azul de Alcian e Ácido Periódico de Schiff em 100x de magnificação.

Na análise histopatológica das amostras de Doença de Crohn foi observada distorção das criptas com superfície normal da mucosa em alguns pontos. Também se observa inflamação crônica com formação de granulomas e fibrose intensa. Ainda em Doença de Crohn um dos aspectos microscópicos relevantes é o aumento do infiltrado inflamatório linfoplasmocitário na porção inferior da mucosa. Na fase ativa da doença notam-se polimorfonucleares agredindo o epitélio glandular, as chamadas criptites ou em aglomerados formando microabcessos.

Nas biópsias de pacientes com retocolite podemos visualizar atrofia e distorção mais difusa das criptas, com irregularidades na superfície da mucosa, sendo esses achados típicos da patogênese da retocolite ulcerativa, bem como, também podemos observar, áreas discretas de fibrose.

3.6 Estudo imunoquimioluminescente

A expressão da Calprotectina e ADAM10 foi observada com maior expressividade em pacientes portadores de RCU do que em pacientes portadores de DC e os resultados estão apresentados na figura 3. Os valores de URL foram iguais a 294854 ± 12418 ULR para os pacientes de RCU e de 227831 ± 10320 URL para DC, enquanto que um valor de 5922 ± 2719 ULR foi encontrado no controle. O ensaio foi realizado em triplicata para determinação das médias e desvio padrão.

Tanto para a calprotectina, quanto para ADAM10, as médias entre os valores de ULR dos grupos de pacientes portadores de DII com infecção fúngica associada e tecido normal foi significativamente diferente ($p < 0,05$), conforme observado com o teste estatístico paramétrico de Tukey. No entanto, foi observado variação estatisticamente significativas entre os valores de RCU e DC (Figura 3).

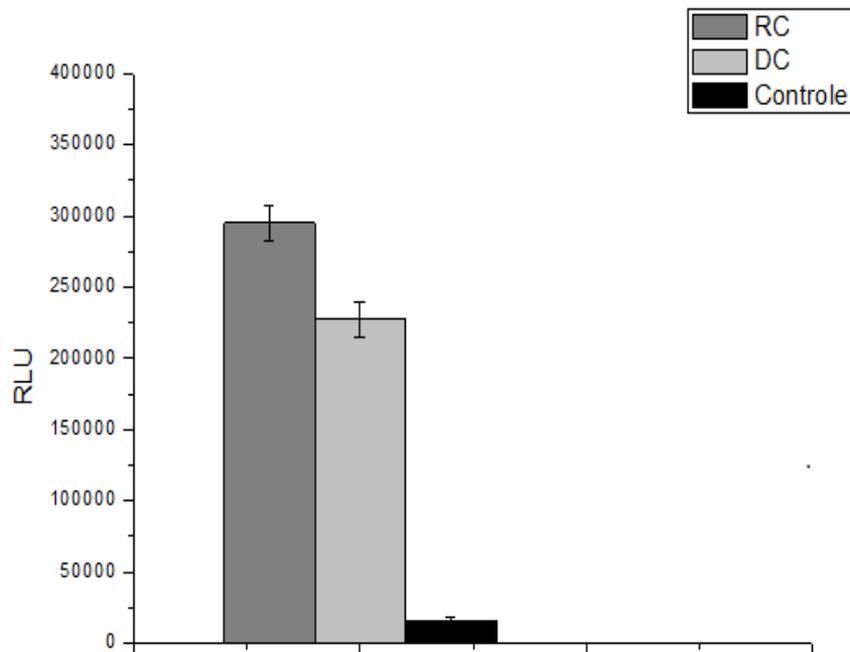


Fig 3: Comparação entre a imunoquimioluminescência, da doença de Crohn, da retocolite ulcerativa e do controle marcado com AntiCalprotectina-EA e AntiADAM10-EA. Foram observadas variações estatisticamente significativas entre os valores de ULR das doenças inflamatórias intestinais e o controle considerando $p < 0.05$.

4. DISCUSSÃO

Pacientes imunossuprimidos são comumente acometidos por infecções fúngicas causadas por leveduras do gênero *Candida sp.* [12]. Algumas espécies já são conhecidas como agentes etiológicos das candidíases como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Contudo já foram descritas mais de 40 espécies diferentes de *Candida* capazes de causar infecções em seres humanos [30].

A identificação correta das espécies de *Candida*, bem como seu perfil de sensibilidade aos antifúngicos, se mostra de grande importância no tratamento dos pacientes acometidos por leveduroses, pois, as cepas podem apresentar diferentes perfis de sensibilidade, inclusive, entre cepas de mesma espécie [31].

O uso do MALDI-TOF MS para identificação de leveduras já tem sido amplamente utilizado em todo o mundo, e estudos mostram que a técnica consegue identificar os isolados corretamente em cerca de 98% das análises para *Candida albicans* e não-*albicans*. Algumas espécies ainda não possuem espectro proteico conhecido, o que dificulta a identificação de leveduras responsáveis por causar

micoses emergentes [30,32]. No presente estudo a técnica de MALDI-TOF MS identificou corretamente (tabela 1) todos os isolados obtidos sendo a identificação confirmada posteriormente por biologia molecular (tabela 2).

As cepas de *C. albicans* e *C. glabrata* obtidas foram confirmadas taxonomicamente utilizando primers espécie-específicos para cada espécie. E o isolado de *C. lusitaniae* foi identificado por sequenciamento do material genético fúngico obtido. A identificação de leveduras utilizando biologia molecular é a técnica mais eficiente atualmente, além de apresentar maior sensibilidade e especificidade quando comparada a métodos de identificação convencionais [33].

O biofilme microbiano é formado por estruturas multicelulares que aderem à superfície através de células basais, sendo resultado de um processo adaptativo a resposta imunológica do hospedeiro, privação de nutrientes ou outros tipos de estresses ambientais, conferindo aos microrganismos resistência ao sistema imunológico do hospedeiro e as drogas antimicrobianas [34]. Os isolados obtidos apresentaram resultados positivos quanto a capacidade de produção de biofilme (figura 1), semelhante a literatura, entretanto, em diferentes intensidades variando de acordo com a espécie [35-37].

A miltefosina foi originalmente desenhada como droga antitumoral. Porém, seus efeitos contra vários tipos de parasitas já foram relatados em vários estudos prévios com *Schistosoma*, *Entamoeba*, *Cryptosporidium*, *Toxoplasma*, *Trichomonas*, dentre outros [38-40]. Um estudo recente avaliou os efeitos da MTF em *Paracoccidioides spp.* e a indução de melanização das leveduras [41]. Outro estudo avaliou, e obteve resultados significativos, quanto a inibição do crescimento de *Cryptococcus* através de indução de apoptose nas leveduras [42].

No presente estudo foi observado uma diferença nas CIM's da miltefosina tanto em cepas de espécie diferentes como em cepas da mesma espécie além das concentrações se apresentarem de forma semelhante em relação as concentrações para anfotericina B (tabela 3). Além da inibição do crescimento das leveduras obtidas no presente estudo, em outro trabalho utilizando cepas de *Candida*, a MTF também se mostrou eficaz na inibição da formação de biofilme produzido por estas leveduras [21].

Um estudo avaliou a sensibilidade de análogos da MTF contra cepas de *Candida* além de outros fungos a fim de sintetizar uma molécula que conferisse maior eficiência contra as leveduras. Alguns análogos foram mais eficazes na inibição do crescimento das cepas mostrando que a MTF é uma droga com potencial antifúngico promissor [43].

A tabela 3 mostra que as cepas do presente estudo da espécie *C. albicans* e *C. glabrata* foram sensíveis a micafungina com exceção da *C. lusitaniae* que apresentou CIM de 1.0 µg/mL para a mesma droga. Contudo, as equinocandinas, por serem fármacos de administração realizada por via intravenosa, não podem ser utilizadas pelos pacientes de forma independente o que dificulta seu uso em domicílio. Apesar de serem uma geração de drogas muito eficientes em infecções fúngicas invasivas, alguns estudos também mostram que muitas cepas, dentre elas da espécie *C. glabrata*, apresentam ou desenvolvem resistência a esta classe de medicamentos [44-45].

Os achados histopatológicos deste estudo estão de acordo com as publicações mais recentes sobre o tema e com o consenso europeu de histopatologia das doenças inflamatórias intestinais publicado em 2013 por Magro e colaboradores. A mudança na arquitetura das criptas e a presença de inflamação crônica estão diretamente associadas a histopatologia das doenças inflamatórias intestinais tanto para doença de Crohn quanto para a retocolite [46].

Apesar da avaliação do grau de depleção de glicoproteínas ainda ser considerado um fator subjetivo na literatura, nota-se maiores graus de depleção nas fases mais ativas das doenças inflamatórias intestinais. A identificação das características histológicas em biópsias de lesões sugestivas de doenças inflamatórias intestinais possibilita a subclassificação dessas enfermidades. Mas cabe ressaltar que outros fatores e principalmente os exames de imagem são essenciais para conclusão do diagnóstico diferencial dessas doenças [47].

A calprotectina é uma proteína presente em neutrófilos que é ativada durante estresse celular e já tem sido sugerida como importante biomarcador para determinar gravidade do processo inflamatório intestinal [48]. Outros estudos corroboram sua importância no diagnóstico das doenças inflamatórias intestinais, bem como, na determinação da atividade das doenças e sua importante função como preditor de recidivas dessas enfermidades [49].

Estudos clínicos mostram que a detecção de calprotectina pode preceder a visualização macroscópicas das lesões em pacientes com DC e RCU por apresentar uma boa correlação com a atividade inflamatória e cicatrização da mucosa intestinal em indivíduos portadores de DII [50].

A ADAM10 é uma proteína transmembrana dependente de zinco que pertence à família das desintegrinas metaloproteinases. Ela possui um domínio de vários ligantes, receptores e moléculas sinalizadoras que permite regular processos de sinalização, adesão e diferenciação celular [51]. É expressa em todo o trato gastrointestinal atuando como reguladora de processos celulares associados ao desenvolvimento intestinal e manutenção das populações de células estaminais. Possui diversos substratos como citocinas, quimiocinas, receptores e moléculas de adesão [23].

Por isso a ADAM10 pode modular as principais vias de sinalização celular em respostas a alterações em seu ambiente extracelular. O conhecimento sobre a ADAM10 é de extrema importância, pois, a desregulação desses processos em qual está envolvida está associada a estados patológicos como inflamação e câncer [23].

Um estudo demonstrou uma alta expressão de ADAM10 e ADAM19 na mucosa de pacientes portadores de doenças inflamatórias intestinais determinadas através de PCR em tempo real, Western blotting, e imuno-histoquímica, apresentando resultados semelhantes as biópsias controle, sugerindo a existência de um feedback positivo envolvendo as citocinas e a ADAM19, mecanismo que pode aumentar a produção de citocinas nas DII [52].

Diferentemente do presente estudo onde foi observado uma expressão maior de ADAM10 em pacientes portadores de DII e infecção por *Candida*, em relação as biópsias controle, o que pode estar associado a sensibilidade da imunoquimioluminescência, método utilizado para a determinação dos níveis de ADAM10 e de Calprotectina no presente estudo.

Através deste método, pequenas quantidades de antígeno podem ser detectadas nas biópsias dos pacientes. Os valores obtidos em nosso estudo demonstram a alta sensibilidade de detecção dos antígenos estudados e a boa estabilidade analítica dos testes que utilizam imunoquimioluminescência.

5. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos no presente estudo, foi possível determinar a ocorrência de candidíase nos pacientes portadores de doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa. Os resultados da identificação proteômica foram confirmados pela identificação por biologia molecular, mostrando que a técnica de MALDI-TOF MS se mostrou eficiente na identificação das espécies de *Candida* isoladas.

As cepas obtidas apresentaram alta capacidade de produção de biofilme em quantidade semelhante a cepa padrão utilizada no estudo. Foi observado que as cepas respondem de maneira diferente aos antifúngicos utilizados na prática clínica mesmo em indivíduos de mesma espécie corroborando a ideia de que é importante se conhecer o perfil de sensibilidade aos antifúngicos de todos os grupos de microrganismos isolados de diferentes tipos de substratos. A maioria das cepas apresentaram CIM menores ou iguais da Miltefosina quando comparados a ação da Anfotericina B.

Através do estudo histopatológico com as colorações utilizadas foi possível determinar o perfil histológico dos intestinos de pacientes portadores de DII associado a infecções por *Candida*.

A detecção imunoquimioluminescente permitiu a quantificação da calprotectina e da ADAM10 nos tecidos dos pacientes estudados com significância estatística relevante quando comparado com tecidos normais. Estes resultados ajudam a consolidar a calprotectina como importante biomarcador no diagnóstico e manejo das doenças inflamatórias intestinais, bem como, sugere a ADAM10 como potencial biomarcador de doenças do sistema digestório, principalmente, em relação as doenças inflamatórias intestinais.

6. REFERÊNCIAS

- [1] Abraham C, Cho JH, N. Inflammatory Bowel Disease. J. Med. Engl 361 2009; 2066–2078.
- [2] Moradkhani, LJ, Beckman JH, Tabibian J. Crohns Colitis 2013; 467–473.

- [3] Kaplan GG. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 12 2015; 720–727.
- [4] Molodeck NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G et al. *Gastroenterology* 142 2012; 46–54 (e42; quiz e30).
- [5] Ho GT, Lees C, Satsangi J. *Ulcerative colitis. Medicine* 2007; 35, 277–282.
- [6] Ordás I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC, Sandborn WJ. *Ulcerative colitis. 2012; Lancet* 380, 1606–1619.
- [7] Chassaing, A. Darfeuille-Michaud, *Gastroenterology* 140 2011; 1720–1728.
- [8] Van Kruiningen HJ., Poulin M, Garmendia AE. Search for evidence of recurring or persistent viruses in Crohn's disease. *APMIS*, 2007; 115:962– 968.
- [9] Martinelli VF. Perfil clínico-epidemiológico e ocorrência de infecção pelo Citomegalovírus em pacientes com doença inflamatória intestinal em hospital de referência no Nordeste do Brasil. 2013 (dissertação de mestrado).
- [10] Gomes RG. Associação de polimorfismos nas sequências regulatórias dos genes HLA-G, IL-10 e TNF e a sua respectiva expressão gênica em lesões de mucosa em pacientes portadores de doença inflamatória intestinal. 2014. (tese de doutorado)
- [11] Santos NF. Fatores de risco microbiológicos e ambientais na doença inflamatória intestinal: uma revisão. 2016. (dissertação de mestrado).
- [12] Wang, X, Van DV, Frank LN, Mihai G. Basic genetics and immunology of *Candida* infections. *Infectious Disease Clinics*, 2016; v. 30, n. 1, p. 85-102.

- [13] Standaert-Vitse A, Sendid B, Joossens M, et al. *Candida albicans* colonization and ASCA in familial Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2009.
- [14] Dignass A, Lindsay JO, Sturm A, Windsor A, Colombel JF, Allez M, D'Haens G, D'Hoore A, Mantzaris G, Novacek G, Öresland T, Reinisch W, Sans M, Stange E, Vermeire S, Travis S, Van Assche G. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 2: current management. *J. Crohns Colitis* 6 2012;991–1030.
- [15] Mowat C, Cole A, Windsor A, Ahmad T, Arnott I, Driscoll R, Mitton S, Orchard T, Rutter M, Younge L. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. 2011; *Gut* 60, 571–607.
- [16] Urbina JA. Mechanisms of action of lysophospholipid analogues against trypanosomatid parasites. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006;100(Suppl. 1):S9–16.
- [17] Dorlo TPC, Balasegaram M, Beijnen JH, De Vries PJ. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:2576–97.
- [18] Brilhante RSN, Caetano EP, Lima RAC, Castelo Branco DSCM, Serpa R, Oliveira JS, et al. In vitro antifungal activity of miltefosine and levamisole: their impact on ergosterol biosynthesis and cell permeability of dimorphic fungi. *J Appl Microbiol* 2015;119:962–9.
- [19] Borba-Santos LP, Gagini T, Ishida K, de Souza W, Rozental S. Miltefosine is active against *Sporothrix brasiliensis* isolates with in vitro low susceptibility to amphotericin B or itraconazole. *J Med Microbiol* 2015;64:415–22.
- [20] Vila TVM, Chaturvedi AK, Rozental S, Lopez-Ribot JL. In vitro activity of miltefosine against *Candida albicans* under planktonic and biofilm growth

conditions and in vivo efficacy in a murine model of oral candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:7611–20.

- [21] Vila TVM, Quintanilha NS, Rozental S. Miltefosine is effective against *Candida albicans* and *Fusarium oxysporum* nail biofilms in vitro. *J Med Microbiol* 2015;64:1436–49.
- [22] Kotze LMS, Nisihara RM, Marion SB, Cavassani MF, Kotze PG. Fecal calprotectin: levels for the ethiological diagnosis in Brazilian patients with gastrointestinal symptoms. *Arquivos de Gastroenterologia*, 2016; v. 52, n. 1, p. 50–54.
- [23] Dempsey PJ. Role of ADAM10 in Intestinal Crypt Homeostasis and Tumorigenesis, *BBA - Molecular Cell Research*, 2017.
- [24] Barnett JÁ, Payne RW, Yarrow D. *Yeasts: Characteristics and Identification*. 2nd edn. Cambridge. Cambridge University Press 1990.
- [25] Lima-Neto R et al. Application of MALDI-TOF MS for requalification of a *Candida* clinical isolates culture collection. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2014; v. 45, n. 2, p. 515-522.
- [26] Van Veen, Sq, Claas Ecj, Kuijper. Ed J. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *Journal of clinical microbiology* 2010; v. 48, n. 3, p. 900-907.
- [27] Melo AS, Bizerra FC, Freymüller E, Arthington-Skaggs BA, Colombo AL. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. *Med Mycol*. 2011; v.49, n.3, p.253–62.

- [28] CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Third Informational Supplement. CLSI document M27-S3. Wayne P.A: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
- [29] Campos F, Guillen G, Reyes JL, Covarrubias AA. A general method of protein purification of recombinant unstructured non-acidic proteins. *Protein Expression and Purification*, 2011; v.80, n. 1, p. 47–51.
- [30] Lacroix C. et al. Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of *Candida* species. *Clin Microbiol Infect*, 2014; v. 20, n. 2, p. 153-8.
- [31] Clark AE et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev*, 2013; v. 26, n. 3, p. 547-603.
- [32] Haas M et al. Identification of cryptic *Candida* species by MALDI-TOF mass spectrometry, not all MALDI-TOF systems are the same: focus on the *C. parapsilosis* species complex. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 2016; v. 86, n. 4, p. 385-386.
- [33] Zhang J, Hung GC, Nagamine K, Li B, Tsai S, Lo SC. Development of *Candida*-Specific Real-Time PCR assays for the detection and identification of eight medically important *Candida* species. *Microbiology Insights*, 2016; v. 9, p. 21-28.
- [34] Rossoni, RD. Isolamento e caracterização de *Lactobacillus spp.* da cavidade bucal e sua ação probiótica sob *Candida albicans*: formação de biofilme, infecção em modelos de invertebrados e expressão dos genes EFG1, HWP1 e ALS1. 2017.
- [35] Ramage GV et al. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Ver Iberoam Micol*, 2010; Vol 18 p.163-170.

- [36] Rebhahm BR. Consequências da aquisição da resistência à natamicina em espécies de *Candida*. 2017.
- [37] Hosida TY et al. Interactions between *Candida albicans* and *Candida glabrata* in biofilms: Influence of the strain type, culture medium and glucose supplementation. *Mycoses*, 2018; v. 61, n. 4, p. 270-278.
- [38] Eissa MM et al. Could miltefosine be used as a therapy for toxoplasmosis? *Experimental parasitology*, 2015; v. 157, p. 12-22.
- [39] Mahmood MN et al. Introducing Miltefosine as an Anti-cryptosporidial Agent in Immunocompromised Mice. *J Plant Pathol Microbiol*, 2016; v. 7, n. 354, p. 2.
- [40] El-Faham MH et al. Treatment of *Schistosoma mansoni* with miltefosine in vitro enhances serological recognition of defined worm surface antigens. *PLoS neglected tropical diseases*, 2017; v. 11, n. 8, p. e0005853.
- [41] Rossi DCP et al. Miltefosine is fungicidal to *Paracoccidioides spp.* yeast cells but subinhibitory concentrations induce melanisation. *International journal of antimicrobial agents*, 2017; v. 49, n. 4, p. 465-471.
- [42] Spadari C et al. Miltefosine has post-antifungal effect and induces apoptosis in *Cryptococcus* yeasts. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2018; p. AAC. 00312-18.
- [43] Ravu RR et al. Synthesis and antifungal activities of miltefosine analogs. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 2013; v. 23, n. 17, p. 4828-4831.
- [44] Beyda ND, Lewis Russell E, Garey KW. Echinocandin resistance in *Candida* species: mechanisms of reduced susceptibility and therapeutic approaches. *Annals of Pharmacotherapy*, 2012; v. 46, n. 7-8, p. 1086-1096.

- [45] Dudiuk CB. Subunidades Fksp del complejo beta-1, 3-D-glucan sintasa de *Candida glabrata*: rol en la síntesis de la pared celular, en la resistencia a las equinocandinas y como marcadores de resistencia clínica. 2017.
- [46] Magro F et al. European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease. *Journal Crohns Colitis*. 2013; 7 (10); 827-851.
- [47] Feakins RM. Ulcerative colitis or Crohn's disease? Pitfalls and problems. *Histopathology*. 2014; 64;317-335.
- [48] Moussa, R et al. Níveis de calprotectina fecal em neonatos prematuros com e sem intolerância alimentar. *Jornal de Pediatria*, 2016; v. 92, n. 5, p. 486-492.
- [49] Iglesias RF. Calprotectina fecal como predictor de recidiva en pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal en remisión a tratamiento con biológicos. 2017 (tese de doutorado).
- [50] Burri E, Beglinger C, Felten SV, Lehmann FS. Fecal calprotectin and the clinical activity index are both useful to monitor medical treatment in patients with Ulcerative Colitis. *Digestive Diseases and Sciences*, 2014; v. 60, n. 2, p. 485–491.
- [51] Zhang P et al. ADAMs family and relatives in cardiovascular physiology and pathology. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2016; v. 93, p. 186-199.
- [52] Franzè E et al. High expression of the “A Disintegrin And Metalloprotease” 19 (ADAM19), a sheddase for TNF- α in the mucosa of patients with inflammatory bowel diseases. *Inflammatory bowel diseases*, 2013; v. 19, n. 3, p. 501-511.

5 CONCLUSÃO

A Doença Inflamatória Intestinal apresenta grande importância devido ao aumento na incidência e prevalência nos últimos anos ao redor do mundo. O Brasil é considerado país de baixa prevalência, apesar de publicações nacionais relatarem um aumento de sua incidência nas últimas décadas de pesquisa.

Com o presente estudo foi possível verificar o perfil epidemiológico dos pacientes portadores de doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa atendidos no setor de gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFPE, um setor de referência no diagnóstico das doenças inflamatórias intestinais em Pernambuco.

Os resultados desse estudo demonstraram uma prevalência de DII em pacientes do sexo feminino, com uma idade média de 25,8 anos. Entre as doenças avaliadas a maior ocorrência foi de retocolite ulcerativa, e a mesalazina apresentou-se como o fármaco mais utilizado no tratamento destes pacientes. Uma pequena parcela dos acometidos relatou a ocorrência de DII associada à diabetes e/ou hipertensão, e um quantitativo menor dos entrevistados também se declarou fumante ou ex-fumante.

Estudos epidemiológicos sobre DII no Brasil ainda são bastante escassos, e até o presente momento nenhum trabalho avaliando o perfil epidemiológico dos pacientes com DII em Pernambuco tinha sido realizado. Esses achados ratificam a importância de estudos desse gênero para uma maior compreensão e distribuição da doença no país.

Com os resultados obtidos no presente estudo, foi possível identificar a ocorrência de candidíase nos pacientes portadores de doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa. A identificação proteômica foi confirmada pela identificação por reação em cadeia da polimerase e sequenciamento, mostrando que a técnica de MALDI-TOF MS é uma importante ferramenta na identificação das espécies de *Candida*.

As cepas de *Candida* apresentaram capacidade de produção de biofilme considerável comparado a cepa padrão. Foi observado que as espécies respondem de maneira diferente aos antifúngicos utilizados comumente, mesmo em indivíduos de mesma espécie, corroborando a ideia de que é importante se conhecer o perfil de sensibilidade aos antifúngicos dos grupos de microrganismos isolados de diferentes

amostras. A Miltefosina se mostrou eficiente contra os isolados obtidos, sugerindo-a como um possível novo antifúngico.

Através do estudo histopatológico com as colorações utilizadas foi possível determinar o perfil histológico dos intestinos de pacientes portadores de DII associado a infecções por *Candida*.

A detecção de moléculas por imunoquimioluminescência permitiu a quantificação da calprotectina e da ADAM10 nos tecidos dos pacientes estudados com significância estatística relevante quando comparado com tecidos normais. Estes resultados consolidam e confirmam a calprotectina como importante biomarcador no diagnóstico e terapêutica das doenças inflamatórias intestinais, bem como, sugere a ADAM10 como potencial biomarcador de doenças do sistema digestório, principalmente, em relação as doenças inflamatórias intestinais.

A relação das infecções por fungos em pacientes com DII é complexa e pouco elucidada. Portanto se faz necessário mais pesquisas para definir o papel da *Candida* no processo natural das DII para que se possa compreender de forma mais clara o papel dos microrganismos na fisiopatologia da doença de Crohn e da Retocolite Ulcerativa.

REFERÊNCIAS

ARANTES, J. A. V.; SANTOS, C. H. M.; DELFINO, B. M.; SILVA, B. A.; SOUZA, R. M. M.; SOUZA, T. M. M.; FLÁVIO, I. D.; FERREIRA, C. G.; GOMES DA CRUZ, S. B. Epidemiological profile and clinical characteristics of patients with intestinal inflammatory disease, **Journal of Coloproctology** [internet]. v. 37, n. 4, p. 273-278, 2017.

ÁVILA, K. et al. Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. Una revisión. **Revista biomédica**, v. 27, n. 3, p. 127-136, 2016.

BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. L. S. Candidíase. DST – **J Bras Doenças Sex Transm.**, v. 22, n. 1, p. 22-38, abr. 2010.

BARNETT, J.Á; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: Characteristics and Identification**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press 1990.

BRILHANTE, R. S. N.; FECHINE, M. A. B.; CORDEIRO, R. A.; ROCHA, M. F. G.; RIBEIRO, J. F.; MONTEIRO, A. J.; LIMA, R. A. C.; MESQUITA, J. R. L.; CAMARGO, Z. P.; SIDRIM, J. J. C. In vitro effect of sulfamethoxazole-trimethoprim against *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 54, n. 9, p. 3978-3979, 2010.

BRUNTON, L.L., CHABNER, B. A., KNOLLMANN, B. C. Goodman & Gilman: **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12. Ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Brasil, 2012.

CAMMAROTA, G.; IANIRO, G.; CIANCI, R.; BIBBÒ, S.; GASBARRINI, A.; CURRÒ, D. The involvement of gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: Potential for therapy. **Pharmacol Ther.** v. 149, p. 191-212, 2015.

CAMPOS, F.; GUILLEN, G.; REYES, J.L.; COVARRUBIAS, A. A. A general method of protein purification of recombinant unstructured non-acidic proteins. **Protein Expression and Purification**, 2011; v.80, n. 1, p. 47–51

CARDOSO, C. C. N. D. **Avaliação do potencial anti-inflamatório de micropartículas contendo triancinolona no modelo de colite ulcerativa experimental** 2016. 52f. Dissertação (Mestrado em Biologia Estrutural e Funcional) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016.

CARRIÈRE J. Infectious etiopathogenesis of Crohn's disease. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 34, p. 12102, 2014.

CARVALHO, C. P. R. N. D. **A microbiota e as doenças inflamatórias intestinais**. 2017. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa, Portugal. 2017.

CCFA - Crohn's e Colitis Foundation of America (2018). **The facts about Inflammatory Bowel Diseases**. Disponível em: <http://www.crohnscolitisfoundation.org/assets/pdfs/updatedibdfactbook.pdf>. Acessado em maio de 2018.

CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**; Third Informational Supplement. CLSI document M27-S3. Wayne P.A: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

CORDEIRO, R. A.; COELHO, C. G. V.; BRILHANTE, R. S. N.; SIDRIM, J. J.; CASTELOBRANCO, D. S.; MOURA, F. B.; ROCHA, M. F. Serological evidence of *Histoplasma capsulatum* infection among dogs with leishmaniasis in Brazil. **Acta Tropica**, v. 119, n. 2-3, p. 203-205, 2011.

CORRIDONI, D.; ARSENEAU, K. O.; COMINELLI, F. Inflammatory bowel disease. **Immunol Lett**, v. 161, n. 2, p.231-235, out. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2014.04.004>..

COWARD, S.; KAPLAN, G.G. IBD in the New World, Old World, and Your World. In: COHEN (Ed.). **Inflammatory Bowel Disease**. Chicago: The University of Chicago Medicine, 2017. p. 13-27.

DORLO, T. P. C.; BALASEGARAM, M.; BEIJNEN, J. H.; VRIES, P. J. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2576 – 2597, 2012.

EL-FAHAM, M. H. et al. Treatment of *Schistosoma mansoni* with miltefosine in vitro enhances serological recognition of defined worm surface antigens. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 8, p. e0005853, 2017.

FARUCK, M. O.; CHOWDHURY, F. Y. S. An overview of antifungal peptides derived from insect. **Peptides** v. 80, p. 80-88, 2016.

FRÓES, R. et al. The socio-economic impact of work disability due to inflammatory bowel disease in Brazil. **The European Journal of Health Economics**, v. 19, n. 3, p. 463-470, 2018.

GISBERT, P.; MARÍN, A. C.; CHAPARRO, M. The risk of relapse after anti-TNF discontinuation in inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analysis. **The American journal of gastroenterology**, v. 111, n. 5, p. 632, 2016.

GOMES, R. G. **Associação de polimorfismos nas sequências regulatórias dos genes HLA-G, IL-10 e TNF e a sua respectiva expressão gênica em lesões de mucosa em pacientes portadores de doença inflamatória intestinal**. 2014. 84 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, 2014.

GREGORY, M.; SEBEPOS-ROGERS, M.R.C.P.; DAVID S.; RAMPTON, F.R.C.P. Herbs and Inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology Clinics of North America**. v. 46, n. 4, p. 809-824, 2017.

HOLD, G.L.; SMITH, M.; GRANGE, C.; WATT, E. R.; EL-OMAR, E. M.; MUKHOPADHYA, I. Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: What have we learnt in the past 10 years? **World J Gastroenterol**. v. 20, n. 5, p. 1192, 2014.

ILIEV, I. D.; FUNARI, V. A.; TAYLOR, K. D.; NGUYEN, Q.; REYES, C. N.; STROM, S. P.; et al. Interactions Between Commensal Fungi and the C-Type Lectin Receptor Dectin-1 Influence Colitis. **Science**, v. 336, n. 6086, p. 1314-1317, 2012.

ISRAELI, E.; RYAN, J. D.; SHAFER, L. A.; BERNSTEIN, C. N. Younger age at diagnosis is associated with panenteric, but not more aggressive, Crohn's disease. **Clin. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 12, n. 1, p. 72-79. e1, 2014.

ITAGAKI, M.; SARUTA, M.; LINUMA, T.; ARIHIRO S.; KATO, T.; TAJIRI, H. Infliximab- and immunosuppressant-resistant Crohn's disease successfully treated with adsorptive granulocyte apheresis combined with prednisolone. **Case Reports in Gastroenterology**, v. 6, n. 1, p.118-123, 2012.

KAWALEC, P.; MALINOWSKI, K. P. Indirect health costs in ulcerative colitis and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. **Expert Rev. Pharmacoecon.** v. 15, n. 2, p. 253-266, 2015.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J.C. Robbins e Cotran **Patologia - Bases patológicas das doenças**. 8. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 2476p.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica**, 9. Ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104p.

LACERDA, G. J. S. **Micropartículas de quitosana como sistema de liberação colônica de mesalazina no tratamento da doença inflamatória intestinal**. 2018. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2018.

LIMA, B. **Anfotericina B pré-aquecida: avaliação da atividade frente a isolados clínicos de Candida spp. do HU-UFSC**. 2017. 74 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2017.

LIMA-NETO, R. et al. Application of MALDI-TOF MS for requalification of a Candida clinical isolates culture collection. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2014; v. 45, n. 2, p. 515-522

LIN, J. F.; CHEN, J. M.; ZUO, J. H.; YU, A.; XIAO, Z. J.; DENG, F. H.; et al. Meta-analysis: fecal calprotectin for assessment of inflammatory bowel disease activity. **Inflamm Bowel Dis**. v. 20, n. 8, p. 1407-1415, 2014.

LONGO, D. L.; FAUCI, A. S. **Gastrenterologia e Hepatologia de Harrison**. 2. Ed. Porto Alegre: AMGH, Editora, 2015. 600p.

LOPES, M. M. A. M. **Utilização de agentes biológicos na doença inflamatória intestinal em idade pediátrica**. 2017. 46f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina) – Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2017.

LORETO, E. S. et al. *In vitro* activities of miltefosine and antibacterial agents from macrolide, oxazolidinone, and pleuromutilin classes against *Pythium insidiosum* and *Pythium aphanidermatum*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n. 3, p. e01678-17, 2018.

MALAQUIAS, Â. D. M. **Efeito inibitório in vitro de miltefosina frente à cepas de histoplasma capsulatum var. capsulatum e sporothrix spp.** 2013. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2013.

MARTINELLI, V. F. **Perfil clínico-epidemiológico e ocorrência de infecção pelo citomegalovírus em pacientes com doença inflamatória intestinal em hospital de referência no Nordeste do Brasil. Recife,** 2013. 126 f. Dissertação (mestrado) - UFPE, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, 2013

MELO, A.S.; BIZERRA, F.C.; FREYMÜLLER, E.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.A.; COLOMBO, A. L. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. **Med Mycol.** 2011; v.49, n.3, p.253–62.

MOREIRA, L. S. et al. Estudo da resistência aos antifúngicos de leveduras isoladas de candidúrias de um hospital de médio porte. **Revista Univap**, v. 23, n. 43, p. 44-52, 2017.

NGUYEN, G. C.; BRESSLER, B. A tale of two cohorts: are we overestimating the risk of colorectal cancer in inflammatory bowel disease? **Gastroenterology**. v. 143, n. 2, p. 288-290, 2012.

NISHIHARA, R. M. et al. Diagnostic role and clinical association of ASCA and ANCA in Brazilian patients with inflammatory bowel disease. **Digestive Diseases and Sciences**, United States, v. 55, n. 8, p. 2309–2315, 2010.

OLIVEIRA, T. C. B.; LIMA, M. M.; COELHO, C. M. S.; FREITAS, M. F. A. B.; SILVA, T. A. E.; OLIVEIRA, J. C. Perfil clínico-epidemiológico de pacientes com doença inflamatória intestinal internados no Hospital Universitário da Universidade Federal do Piauí. **J. Ciênc. Saúde** [internet]. v. 1, n. 1, p. 34-40, 2018.

PAPACOSTA, N. G.; NUNES, G. M.; PACHECO, R. J.; CARDOSO, M. V.; GUEDES, V. R. Doença de crohn. **Revista de Patologia do Tocantins**, v. 4, n. 2, p. 25-35, 2017.

QUILICI, F. A.; MISZPUTEN, S. J. et. al. **Guia Prático Doença Inflamatória Intestinal**. 1. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

RAPALA-KOZIK, M. et al. Inactivation of the antifungal and immunomodulatory properties of human cathelicidin LL-37 by aspartic proteases produced by the pathogenic yeast *Candida albicans*. **Infection and immunity**, v. 83, n. 6, p. 2518-2530, 2015.

ROUNTREE, C. B. et al. Vedolizumab and Methotrexate Combination for Moderate to Severe Pediatric Inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology**, v. 152, n. 5, p. S754, 2017.

SAMUEL, S.; BRUINING, D. H.; LOFTUS, E. V.; BECKER, B.; FLETCHER, J. G.; MANDREKAR, J. N.; ZINSMEISTER, A. R.; SANDBORN, W. J. Endoscopic skipping of the distal terminal ileum in Crohn's disease can lead to negative results from

ileocolonoscopy. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 10, n. 11, p. 1253-1259, 2012.

SANTOS, N. F. **Fatores de risco microbiológicos e ambientais na doença inflamatória intestinal: uma revisão**. 2016. 96f. Dissertação (Mestrado integrado em Medicina) - Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal, 2016.

SHERRY, L. et al. Biofilm-forming capability of highly virulent, multidrug-resistant *Candida auris*. **Emerging infectious diseases**, v. 23, n. 2, p. 328, 2017.

SIMÕES, V. C. R. **Infecções pós-transplantes: fúngicas, virais, bacterianas, micobacterianas e parasitárias**. 2017. 19 f. Monografia (Graduação) – Faculdade de Ciências da Educação e Saúde, Centro Universitário de Brasília, Brasília, 2017.

SOBRADO, C. W.; LEAL, R. F.; SOBRADO, L. F. Therapies for Crohn's disease: a clinical update. **Arquivos de Gastroentologia**, v. 53, n. 3, p. 206-211, 2016.

SOOD, A.; AMRE, D.; MIDHA, V.; SHARMA, S.; SOOD, N.; THARA, A; et al. Low hygiene and exposure to infections may be associated with increased risk for ulcerative colitis in a North Indian population. **Ann Gastroenterol**. v. 27, n. 3, p. 219, 2014.

STEVENS, A.; LOWE, J. **Patologia**. 2. Ed. São Paulo: Editora Manole, 2002.

SZETO, W. et al. Subclinical Fibrosis in Inflammatory Bowel Disease Patients on Thiopurines and Methotrexate. **Gastroenterology**, v. 152, n. 5, p. S603, 2017.

TONG, Z.; WIDMER, F.; SORRELL, T. C.; GUSE, Z.; JOLLIFFE, K. A.; HALLIDAY, C.; LEE, O. C.; KONG, F.; WRIGHT, L. C.; SHARON, C. A.; CHEN, S. C. A. *In vitro* activities of miltefosine and two novel antifungal biscationic salts against a panel of 77 dermatophytes. **Antimicrobiology Agents Chemotherapy**, v. 51, n. 6, p. 2219-2222, 2007.

TSIODRAS, S.; SAMONIS, G.; BOUMPAS, D.T.; KONTOYIANNIS, D.P. Fungal infections complicating tumor necrosis factor α blockade therapy. **Mayo Clin Proc**, v. 83, n. 2, p. 135–255, 2008.

VAN KRUININGEN, H. J.; POULIN, M.; GARMENDIA, A. E. Search for evidence of recurring or persistent viruses in Crohn's disease. **APMIS**, v. 115, n. 8, p. 962-968, 2007.

VELOSO, F. T. Manifestações extra-intestinais da doença inflamatória intestinal: Será que eles influenciam o tratamento e o resultado? **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 9, p.769- 775, 2011.

VICTORIA, C. R.; SASSAK, L. Y.; NUNES, H. R. C. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of São Paulo State, Brazil. **Arq Gastroenterol**, v. 46, n. 1, p. 20-25, 2009.

VIEIRA, A. J. H.; DOS SANTOS, J. I. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. **Brazilian Journal of Clinical Analyses**, v. 49, n. 3, p. 235-9, 2017.

WGO - World Gastroenterology Organization Practice Guidelines. **Doença Inflamatória Intestinal (2015)**. Disponível em:

<http://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/inflammatory-bowel-disease-portuguese-2015.pdf>. Acessado em maio de 2018.

WIDMER, F.; WRIGHT, L. C.; OBANDO, D.; HANDKE, R.; GANENDREN, R.; ELLIS, D. H.; SORRELL, T. C. Hexadecylphosphocholine (miltefosine) has broad-spectrum fungicidal activity and is efficacious in a mouse model of cryptococcosis.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 50, n. 2, p. 414–421, 2006.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCÊNCIAS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa: **Estudo histopatológico e avaliação de compostos bioativos frente à isolados de *Candida* obtidos de pacientes com doenças inflamatórias intestinais**, que está sob a responsabilidade do (a) pesquisador (a) Anthony Alves dos Santos Junior, Residente na Rua Capitão Adolfo Taquis, 72, Afogados, Recife-PE, anthonyalves1@gmail.com Fone: (81) 99786.8260, Biomédico, Mestrando pelo Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde – PPGBAS/LIKA/UFPE, Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e está sob a orientação do **Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo-Júnior**, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Patologia, Av. Prof. Nelson Chaves, s/n, Cidade Universitária, Recife-PE, mariormj@gmail.com, Fone: 98853.3380 Professor, DE e Pesquisador. Também participam desta pesquisa: Profa. Dra. Rejane Pereira Neves (81) 2126.8570, Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto (81) 9147-9644, Dr. Humberto Gonçalves Bertão (81) 2126.8570.

Este Termo de Consentimento pode conter informações que o/a senhor/a não entenda. Caso haja alguma dúvida, pergunte à pessoa que está lhe entrevistando para que o/a senhor/a esteja bem esclarecido (a) sobre sua participação na pesquisa. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, caso aceite em fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa o (a) Sr. (a) não será penalizado (a) de forma alguma. Também garantimos que o (a)

Senhor (a) tem o direito de retirar o consentimento da sua participação em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Essa pesquisa tem como objetivo verificar a ocorrência de infecções por fungos do gênero *Candida* em pacientes com Doenças Inflamatórias Intestinais (doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa Inespecífica) e avaliar a sensibilidade destes fungos expostos à ação de novas drogas com potencial antifúngico *in vitro*, bem como realizar estudos histopatológicos das biópsias obtidas no exame de colonoscopia. As coletas serão realizadas em pacientes atendidos e/ou internados no Serviço de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas/UFPE, de acordo com solicitação médica. No momento da realização do exame (colonoscopia) será realizada uma biópsia do intestino e em seguida, um fragmento do tecido será removido e acondicionado em tubos contendo solução salina para diagnóstico laboratorial micológico. Após a obtenção das amostras, diagnóstico laboratoriais para infecção por leveduras as colônias fúngicas serão purificadas e identificadas, e as biópsias seguirão para processamento histopatológico. As amostras clínicas dos pacientes envolvidos serão coletadas no período entre 03/04/2017 e 02/04/2018 de todos os pacientes portadores de Doenças Inflamatórias Intestinais atendidos e/ou internados no Serviço de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas/UFPE. Aos pacientes participantes os prejuízos e riscos envolvidos na pesquisa são mínimos, devido a remoção do fragmento intestinal ser realizado no ato do exame e não será de uso exclusivo da pesquisa sendo a coleta da amostra um procedimento regular para diagnóstico e tratamento dos pacientes. Os participantes estarão sedados sob acompanhamento do médico responsável e se caso algum paciente tenha algum desconforto no momento do procedimento a equipe médica responsável adotará os protocolos padrões para minimizar e reverter o quadro do paciente. Os benefícios diretos aos participantes da pesquisa além dos resultados das culturas e identificação dos microrganismos causadores de doenças (infecções) incluem também, rapidez e precisão no diagnóstico de agentes infecciosos, levando a uma melhor decisão clínica para um tratamento mais eficaz. O avanço do conhecimento terapêutico está diretamente relacionado a uma melhor compreensão dos mecanismos da doença, permitindo que novos medicamentos sejam disponibilizados para uso terapêutico, melhorando assim a qualidade de vida dos portadores das Doenças Inflamatórias Intestinais.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa, ficarão armazenados em computadores e livros de registros pessoais, sob a responsabilidade do pesquisador Anthony Alves dos Santos Junior e Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo-Júnior, nos endereços acima informados, pelo período mínimo de 5 anos.

O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação). Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo “Estudo histopatológico e avaliação de compostos bioativos frente à isolados de *Candida* obtidos de pacientes com Doenças Inflamatórias Intestinais”, como voluntário (a).

Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o

meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento).

Local e data: _____

Assinatura do participante: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

APÊNDICE B – FICHA CLÍNICA

Paciente nº _____

Nome:			
Idade:		Nº do Prontuário:	
Natural:		Procedente:	
Telefone:			
Patologia:	<input type="checkbox"/> Crohn <input type="checkbox"/> RCUI <input type="checkbox"/> DII	Doença em atividade??	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Outras patologias:	<input type="checkbox"/> HAS <input type="checkbox"/> DM <input type="checkbox"/> Outro:	Soropositivo (a)?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Medicações em uso:			
- Imunossupressor?			
() Sim () Não			
- Antibiótico?			
() Sim () Não			
Tabagista?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Cirurgia prévia?	

1) COLETA DAS AMOSTRAS

Data: ____/____/____

- Termo de consentimento
- Prontuário
- Laudo da colonoscopia

2) EXAME DIRETO

Data: ____/____/____

3) CULTURA

Data: ____/____/____

Data: ____/____/____

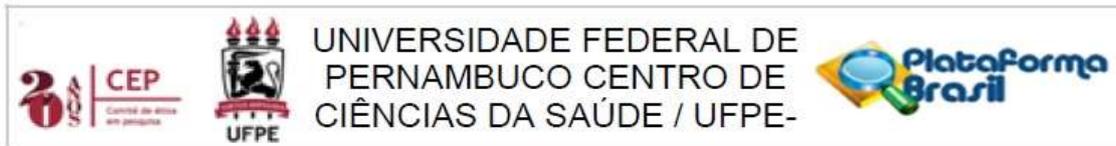
5) IDENTIFICAÇÃO

Data: ____/____/____

6) TESTE DE SENSIBILIDADE

Data: ____/____/____

**ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM
SERES HUMANOS**



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo histopatológico e avaliação de compostos bioativos frente à isolados de *Candida* obtidos de pacientes com Doenças Inflamatórias Intestinais

Pesquisador: ANTHONY ALVES DOS SANTOS JUNIOR

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 63952217.6.0000.5208

Instituição Proponente: LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEISO ASAMI

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.955.690

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de mestrado apresentado ao Programa de Pós Graduação em Biologia Aplicada à Saúde PPGBAS/LIKA, pelo aluno ANTHONY ALVES DOS SANTOS JUNIOR, sob a orientação do prof.º Dr. Mário Ribeiro de Melo Júnior.

Objetivo da Pesquisa:

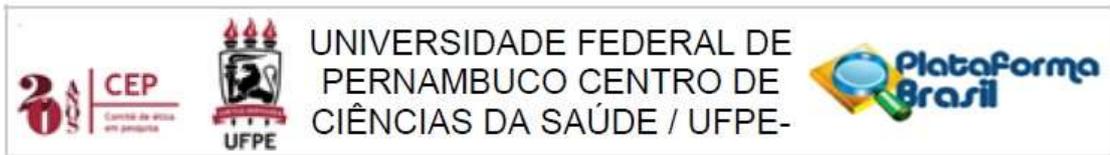
Objetivo Primário:

Realizar análise histopatológica, verificar a ocorrência de candidíase em pacientes com doenças inflamatórias intestinais (doença de Crohn e retocolite ulcerativa inespecífica) e avaliar a sensibilidade dos agentes etiológicos expostos à ação de compostos bioativos com potencial antifúngico in vitro.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os benefícios diretos aos participantes da pesquisa além dos resultados das culturas e identificação dos microrganismos causadores de (infecções) inclui também, rapidez e precisão no diagnóstico de agentes infecciosos, levando a uma melhor decisão clínica para um tratamento mais eficaz. O benefício indireto virá do avanço do conhecimento terapêutico que está diretamente relacionado a uma melhor compreensão dos mecanismos da doença, permitindo que novos medicamentos sejam disponibilizados para uso terapêutico,

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.955.690

melhorando assim a qualidade de vida dos portadores das Doenças Inflamatórias Intestinais.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O tema é relevante. As doenças inflamatórias intestinais constituem um importante problema de saúde pública. Elevada morbidade, principalmente quando associada a infecções secundárias. Dessa forma, existe a necessidade de se descobrir novas estruturas principalmente com propriedades antifúngicas. A obtenção sintética dessas estruturas é uma alternativa que pode conduzir ao desenvolvimento de novas drogas, habilitadas para serem administradas em pacientes com quadros clínicos sistêmicos e oportunistas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

1-Folha de rosto assinada e carimbada pelo diretor do LIKA e com o visto da diretoria de pesquisa do HC/UFPE; 2-Carta de anuência do serviço de gastroenterologia do HC; 3-Carta de anuência do Departamento de Micologia; 4-Termo de compromisso e confidencialidade; 5-Lattes de todos os pesquisadores anexados; 6- TCLE para maiores de 18 anos adequado; 7- Projetos em ambos os formatos adequados;

Recomendações:

Entendemos que o primeiro objetivo secundário "Coletar fragmento do colón" não se trata de um objetivo e sim de uma etapa/ procedimento que deve ser realizado para que os objetivos sejam alcançados. Desse modo sugerimos que seja corrigido em ambos os projetos.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

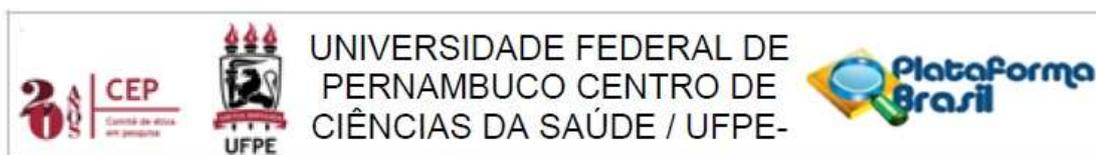
Considerações Finais a critério do CEP:

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio da Notificação com o Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto,

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br



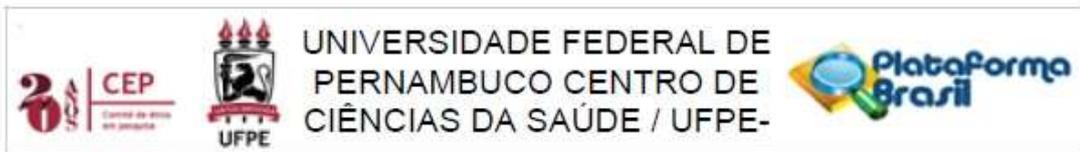
Continuação do Parecer: 1.955.690

identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética, relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_855016.pdf	23/01/2017 11:06:24		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetomestradolika.pdf	23/01/2017 11:06:07	ANTHONY ALVES DOS SANTOS JUNIOR	Aceito
Outros	comprovantedevinculo.pdf	22/01/2017 00:31:42	ANTHONY ALVES DOS SANTOS JUNIOR	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	22/01/2017 00:30:16	ANTHONY ALVES DOS SANTOS JUNIOR	Aceito
Outros	termodeconfidencialidade.pdf	20/01/2017 00:12:12	ANTHONY ALVES DOS SANTOS JUNIOR	Aceito
Outros	lattesreginaldo.pdf	20/01/2017 00:11:32	ANTHONY ALVES DOS SANTOS JUNIOR	Aceito
Outros	lattesrejane.pdf	20/01/2017 00:10:02	ANTHONY ALVES DOS SANTOS JUNIOR	Aceito
Outros	lattes Humberto.pdf	20/01/2017 00:09:29	ANTHONY ALVES DOS SANTOS JUNIOR	Aceito
Outros	lattesmario.pdf	20/01/2017 00:09:11	ANTHONY ALVES DOS SANTOS	Aceito



Continuação do Parecer: 1.955.680

Outros	lattesmario.pdf	20/01/2017 00:09:11	JUNIOR	Aceito
Outros	lattesanthony.pdf	20/01/2017 00:08:40	ANTHONY ALVES DOS SANTOS JUNIOR	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuenciamico.pdf	20/01/2017 00:05:00	ANTHONY ALVES DOS SANTOS JUNIOR	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	anuenciahc.pdf	20/01/2017 00:04:43	ANTHONY ALVES DOS SANTOS JUNIOR	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	20/01/2017 00:01:36	ANTHONY ALVES DOS SANTOS JUNIOR	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 09 de Março de 2017

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)