



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA A SAÚDE

ANA PAULA FERNANDES DA SILVA

**DETECÇÃO HISTOQUIMILUMINESCENTE DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS À  
PATOGENESE DA DOENÇA DE CROHN E RETOCOLITE ULCERATIVA**

Recife  
2021

ANA PAULA FERNANDES DA SILVA

**DETECÇÃO HISTOQUIMILUMINESCENTE DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS À  
PATOGÊNESE DA DOENÇA DE CROHN E RETOCOLITE ULCERATIVA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada a Saúde, do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biologia Aplicada a Saúde. Área de concentração: medicina.

Orientador:

**Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior**  
Departamento de Bioquímica, CB/UFPE

Co-orientador:

**Prof. Dr. Mario Ribeiro de Melo Júnior**  
Área acadêmica de Patologia, CCM/UFPE

Recife

2021

Catálogo na Fonte:  
Elaine C Barroso, CRB-4/1728

Silva, Ana Paula Fernandes da  
Detecção histoquimiluminescente de proteínas associativas à patogênese da doença de Crohn e retocolite ulcerativa / Ana Paula Fernandes da Silva – 2021.

98 f.: il., fig., tab.

Orientador: Luiz Bezerra de Carvalho Junior  
Coorientador: Mario Ribeiro de Melo Junior  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biotecnologias. Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Recife, 2021.  
Inclui referências e anexos.

1. Intestinos- doenças 2. Crohn, doença de 3. Imunohistoquímica I. Carvalho Junior, Luiz Bezerra de (orient.) II. Melo Junior, Mario Ribeiro de (coorient.) III. Título

616.34

CDD (22.ed)

UFPE/CB-2021-322

ANA PAULA FERNANDES DA SILVA

**DETECÇÃO HISTOQUIMILUMINESCENTE DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS À  
PATOGÊNESE DA DOENÇA DE CROHN E RETOCOLITE ULCERATIVA**

/

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada a Saúde, do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Doutora em Biologia Aplicada a Saúde.

Aprovado em: 30/08/2021.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profº. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior (Orientador)  
Departamento de Bioquímica, CB/UFPE  
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE  
Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde da UFPE (PPGBAS/UFPE)

---

Profº. Dr. Mario Ribeiro de Melo Júnior (Co-orientador)  
Departamento de Patologia, CCM/UFPE  
Programa de Pós-graduação em Saúde Translacional (PPGST/UFPE)

---

Profº. Dr. Fabricio Oliveira Souto (Examinador Interno)  
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE  
Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde da UFPE (PPGBAS/UFPE)

---

Profª. Drª. Ivone Antônia de Souza (Examinador Externo)  
Departamento de Antibióticos  
Programa de Pós-graduação em Saúde Translacional (PPGST/UFPE)

---

Profª. Drª. Paloma Lys de Medeiros (Examinador Externo)  
Departamento de Histologia e Embriologia, CCB-UFPE  
Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia (CB/UFPE)

Aos meus avós **Maria José Neves e Evandro Fernandes Neves** (*in memoriam*), por tudo que fizeram e fazem por mim.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Adriana Carla Fernandes e Walmir Oliveira, com quem aprendi, desde muito cedo, a ser forte. Eu sei que vocês fizeram o melhor que puderam.

Aos meus familiares, em especial a minha querida tia, Ana Claudia Fernandes Neves, pela força e suporte incondicional.

Aos meus queridos irmãos, Pedro, Manoel e João, para que vocês não esqueçam o poder transformador do conhecimento.

A Ruan Navarro Manhães, por ter sido calmaria no meio do caos e por não me permitir desistir. Obrigada por tudo.

A minha amiga, Alyne Arruda, por 20 anos de amizade e por sempre me apoiar.

As minhas amigas e colegas de profissão farmacêutica, Deise, Leide e Pamela, por estarmos sempre juntas, mesmo separadas.

A Mirela Riberio, Nathielly Ribeiro e Sarah Mendonça, amigas e parceiras de docência, que estiveram sempre presentes nesse ano tão difícil.

Aos meus orientadores, Prof. Mario Ribeiro e Prof. Luiz de Carvalho, pela disponibilidade, inspiração e valiosos ensinamentos nessa jornada.

A minha amiga Gabriela Ayres, presença fundamental em toda essa trajetória, obrigada pela amizade e apoio em todas as horas.

Ao Luciano Albuquerque de Mello por ter sido meu professor no meu primeiro dia de aula na graduação e por hoje ser meu amigo e parceiro nessa pesquisa.

A todos colegas, professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada a Saúde, em especial ao secretário Fábio Costa.

Aos pacientes que fizeram parte dessa pesquisa, minha mais sincera gratidão.

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

A verdadeira viagem de descobrimento  
não consiste em procurar novas  
paisagens, mas em ter novos olhos.

**Marcel Proust**

## RESUMO

A integridade epitelial e da matriz extracelular é fundamental para manutenção da saúde do trato gastrointestinal. No entanto, tanto na DC quanto na RCU, a permeabilidade intestinal é prejudicada, o que resulta na invasão de numerosas bactérias, seguida por infiltração de células imunes no intestino e desencadeamento do processo inflamatório característico dessas doenças. No presente trabalho os anticorpos para os antígenos da calprotectina, ADAM10, ADAM15 e complexo  $\beta$ -catenina e e-caderina foram submetidos a conjugação com éster de acridina para detecção histoquimiluminescente e imunoistoquímica para avaliação da matriz extracelular em biópsias de pacientes com doença de Crohn (n = 49) e retocolite ulcerativa (n = 105). As características histopatológicas das amostras foram descritas através da aplicação das técnicas histoquímicas de hematoxilina e eosina, *picrosirius red*, tricrômico de Masson, ácido periódico de Shiff e azul de Alcian. O perfil epidemiológico dos pacientes foi estabelecido através de aplicação de questionário sociodemográfico e análise dos prontuários. No estudo histoquimiluminescente os valores de calprotectina, juntamente com a análise dos prontuários permitiu a categorização dos grupos com doença ativa (DC n = 33 e RCU n = 74) e em remissão (DC n = 16 e RCU n = 31). Na análise do colágeno intersticial observou-se maior percentual de colágeno nos tecidos de pacientes em remissão para ambas as formas de DII. Resultados parciais demonstraram uma maior expressão de ADAM 10 e 15 nos grupos com DC ativa e em remissão foram estatisticamente significativos quando comparados entre si e com os controles ( $p < 0,05$ ). Para RCU os valores das ADAMs foram estatisticamente significativos apenas quando comparados com o grupo controle. O complexo  $\beta$ -catenina + e-caderina mostrou alterações na imunorreatividade apenas em amostras de pacientes com ulceração da mucosa.

**Palavras chave:** doença de Crohn; proctocolite; matriz extracelular; medições luminescentes; imunoistoquímica.

## ABSTRACT

Epithelial and extracellular matrix integrity is essential for maintaining the health of the gastrointestinal tract. However, in CD and UC, intestinal permeability is impaired, which results in the invasion of numerous bacteria, followed by infiltration of immune cells in the intestine and triggering the inflammatory process characteristic of these diseases. In the present work, antibodies to the antigens of calprotectin, ADAM10, ADAM15 and  $\beta$ -catenin and e-cadherin complex were submitted to conjugation with acridine ester for histochemiluminescent detection and immunohistochemistry to evaluate the extracellular matrix in biopsies of patients with disease Crohn's disease (n = 49) or ulcerative colitis (n = 105). The histopathological characteristics of the samples were described through the application of hematoxylin and eosin histochemical techniques, picrosirius red, Masson's trichrome, Schiff's periodic acid and Alcian blue. The epidemiological profile of patients was established through the application of a sociodemographic questionnaire and analysis of medical records. In the histochemiluminescent study, the values of calprotectin, together with the analysis of the medical records, allowed the categorization of groups with active disease (DC n = 33 and UC n = 74) and in remission (DC n = 16 and UC n = 31). In the analysis of interstitial collagen, a higher percentage of collagen was observed in the tissues of patients in remission for both forms of IBD. Partial results showed a greater expression of ADAM 10 and 15 in the groups with active and remission CD were statistically significant when compared with each other and with controls (p <0.05). For RCU, the values of ADAMs were statistically significant only when compared to the control group. The  $\beta$ -catenin + e-cadherin complex showed changes in immunoreactivity only in samples from patients with mucosal ulceration.

**Keywords:** Crohn's disease; proctocolitis; extracellular matrix; luminescent measurements; immunohistochemistry.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Quadro conceitual da patogênese das DII.....	17
Figura 2	Mapa epidemiológico global da evolução da DII em 2020.....	18
Figura 3	Fisiopatologia da doença de Crohn.....	20
Figura 4	Localização anatômica e fenótipos das lesões na doença de Crohn.....	21
Figura 5	Aspectos histopatológicos gerais da doença de Crohn.....	22
Figura 6	Manifestações extraintestinais na doença de Crohn.....	23
Figura 7	Localização anatômica das lesões na retocolite ulcerativa.....	24
Figura 8	Fisiopatologia da retocolite ulcerativa.....	25
Figura 9	Aspectos endoscópicos e histológicos gerais da retocolite ulcerativa.....	26
Figura 10	Reconhecimento do dano pelo sistema imune inato e a resposta inflamatória associada.....	28
Figura 11	Estrutura molecular da calprotectina.....	31
Figura 12	Estrutura molecular da ADAM 10.....	32
Figura 13	Interação molecular da ADAM15.....	33
Figura 14	Esquema de reação quimiluminescente dos ésteres derivados de acridina.....	36
Figura 15	Esquema de ensaio imunoquimiluminescente com éster de acridina.....	37
Figura 16	Esquema da reação imunoistoquímica indireta.....	38
Figura 1 (Artigo 1)	The presence of calprotectin in inflammatory lesions related to active Crohn's disease (CD), remissive CD, active ulcerative colitis (UC), remissive UC and controls.....	52
Figura 2 (Artigo 1)	Calprotectin immunoreactivity in an inflammatory infiltrate of IBD.....	52
Figura 1 (Artigo 2)	Comparação entre o perfil histoquimiluminescente da ADAM10 e ADAM15 nos grupos do estudo.....	62
Figura 1 (Artigo 3)	Atrofia das criptas na retocolite ulcerativa.....	72
Figura 2 (Artigo 3)	Padrão inflamatório na retocolite ulcerativa.....	73
Figura 3 (Artigo 3)	Distribuição das glicoproteínas na mucosa intestinal.....	73
Figura 4 (Artigo 3)	Placas de Peyer mostrando hiperplasia nodular linfóide e inflamação transmural em doença de Crohn.....	74

Figura 5 (Artigo 3)	Inflamação granulomatosa em doença de Crohn.....	<b>74</b>
Figura 6 (Artigo 3)	Disposição das fibras colágenas tipo I em paciente com DC.....	<b>75</b>
Figura 7 (Artigo 3)	Fotomicrografias das amostras teciduais para análise do colágeno intersticial em pacientes com doença inflamatória intestinal.....	<b>76</b>
Figura 8 (Artigo 3)	Fibras colágenas e extenso infiltrado inflamatório em paciente com doença de Crohn ativa.....	<b>77</b>
Figura 9 (Artigo 3)	Comparação entre a expressão tecidual da $\beta$ -catenina, e-caderina nos grupos com doença inflamatória intestinal ativa.....	<b>79</b>
Figura 10 (Artigo 3)	Comparação entre a expressão tecidual da $\beta$ -catenina, e-caderina em ulceração da mucosa.....	<b>79</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 (Artigo 1)	Morphometric data of calprotectin immune expression in tissues of patients with Crohn's disease (CD), ulcerative colitis (UC), and controls.....	<b>53</b>
Tabela 1 (Artigo 2)	Valores de URL da ADAM10 nas amostras teciduais de DII e controle.....	<b>62</b>
Tabela 2 (Artigo 2)	Valores de URL da ADAM15 nas amostras teciduais de DII e controle.....	<b>63</b>
Tabela 1 (Artigo 3)	Área média de colágeno intersticial por campo histológico* em tecido intestinal de pacientes com Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa ativa e em remissão.....	<b>77</b>
Tabela 2 (Artigo 3)	Área média de colágeno intersticial por campo histológico* em tecido intestinal de pacientes com Retocolite Ulcerativa ativa e em remissão.....	<b>78</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB - Alcian blue

CDAI - *Crohn's Disease Activity Index*

DAMP - *Damage Associated Molecular Pattern*

DC - Doença de Crohn

DII - Doenças inflamatórias intestinais

EA - Éster de acridina

EGF - *Epidermal Growth Factor*

EROS - Espécies reativas de oxigênio

HE - Hematoxilina e eosina

HOMO - *Highest occupied molecular orbitals*

IL - Interleucinas

LUMO - *Lowest unoccupied molecular orbitals*

MEC - Matriz extracelular

NK - Células *natural killer*

NOD2 - *Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2*

PAS - Periodic acid–Schiff

PBS - Tampão fosfato sódico

PCR - Proteína C reativa

QL - Quimiluminescência

RCU - Retocolite ulcerativa

TGI - Trato gastrintestinal

Th17 - Linfócitos T auxiliar 17

Th2 - Linfócitos T auxiliar 2

TLR - *Toll-like receptors*

TM - Tricrômico de Masson

TNF- $\alpha$  - Tumor Necrosis Fator alpha

UCAI - Ulcerative Colitis Activity Index

ULR - Unidade de luz relativa

VHS - Velocidade de hemossedimentação

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
2.1	Doenças Inflamatórias Intestinais.....	16
2.1.1	<i>Doença de Crohn</i> .....	19
2.1.2	<i>Retocolite Ulcerativa</i> .....	24
2.2	Matriz Extracelular e as DII.....	27
2.3	Biomoléculas Relacionadas as DII.....	30
2.4	ADAM 10.....	32
2.5	ADAM 15.....	33
2.6	Complexo e-caderina e $\beta$ -catenina.....	34
2.7	Ensaio Quimiluminescentes.....	35
2.8	Imunoistoquímica.....	37
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>40</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>41</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>42</b>
5.1	Amostras.....	42
5.2	Aspectos Éticos.....	42
5.3	Aspectos Epidemiológicos.....	43
5.4	Estudo Histopatológico.....	43
5.5	Estudo Imunoquimiluminescente.....	43
5.6	Estudo Imunoistoquímico.....	44
5.7	Análise Histomorfométrica Digital.....	45
5.8	Análise Estatística.....	45
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>46</b>
6.1	Artigo 1: Immunochemiluminescent Detection of Calprotectin in Inflammatory Bowel Disease.....	46
6.2	Artigo 2: Análise Histoquimiluminescente das ADAMs 10 e 15 nas Doenças Inflamatórias Intestinais.....	58
6.3	Artigo 3: Análise Histopatológica e Imunoistoquímica da $\beta$ -catenina e a e-caderina nas Doenças Inflamatórias Intestinais.....	68
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>82</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>84</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>92</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias intestinais (DII) que incluem a doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa (RCU) são descritas como condições crônicas de etiologia multifatorial marcadas por episódios recorrentes de inflamação do trato gastrointestinal (Graham & Xavier, 2020).

Embora haja divergências no que diz respeito à incidência, sítio anatômico de envolvimento, apresentação clínica, evolução e resposta terapêutica, os subtipos DC e RCU compartilham os mesmos aspectos etiológicos (Roda et al., 2020; Taku et al., 2020). A incidência em ascensão, principalmente em países industrializados ocidentais, indica que o surgimento das DII está relacionado à redução da frequência de infecções entéricas, devido a melhorias nas condições de higiene e armazenamento de alimentos. Bem como a uma maior exposição e consumo a produtos industrializados e ultraprocessados, que geram estresse celular a longo prazo (Greuter & Vavricka, 2019).

Modelos experimentais e estudos clínicos propõem que este surgimento é decorrente da ação conjunta de fatores ambientais, imunológicos, microbiológicos e genéticos, que resultam em alterações na integridade da barreira mucosa intraluminal intestinal (Garber & Regueiro, 2019). O fluxo transepitelial de bactérias entéricas promove ativação da imunidade inata desencadeando o processo patológico no trato gastrointestinal (Khalili et al., 2018; Torres et al., 2018).

Os sintomas dos pacientes podem ser indicadores de inflamação e atividade da doença, mas são subjetivos e, muitas vezes, influenciados por outros fatores não inflamatórios da doença, como a fibrose. A combinação dos sinais e sintomas dos pacientes com DII é utilizada em vários índices clínicos que foram criados para calcular a atividade inflamatória *Crohn's Disease Activity Index* (CDAI) para DC e *Ulcerative Colitis Activity Index* (UCAI) para RCU (Abu-Sbeih et al., 2020; Hazel & O'Connor, 2020).

Na ausência de um sintoma patognomônico para o diagnóstico da DC que possibilite a diferenciação com a RCU, outras formas de enterocolites e a síndrome do intestino irritável, o diagnóstico diferencial é baseado na avaliação conjunta de dados clínicos, histórico do paciente, localização e extensão das lesões, exames contrastados de trânsito intestinal e análises laboratoriais, radiológicas, endoscópicas e histológicas (Abraham, Ahmed & Ali, 2017, Friedrich, Pohin & Powrie, 2019).

A mucosa intestinal inflamada contém um grande número de neutrófilos e proteínas derivadas dessas células, como a alfa-1-antitripsina, elastase, calprotectina e lactoferrina. A calprotectina representa 60% da proteína do citosol de neutrófilos e desempenha funções imunorreguladoras e antimicrobianas (Zhou & Liu, 2017). Por refletir as condições de infiltração leucocitária na mucosa intestinal e participar ativamente da patogênese das DII, a calprotectina se torna um marcador ideal para avaliação do processo inflamatório na DC e na RCU (Khaki-Khatibi et al., 2020).

As alterações nos componentes da matriz extracelular (MEC) em toda a estrutura do intestino é uma característica importante das DII. Essas mudanças levam a alterações comportamento celular e tecidual, incluindo promoção e sustentação processos inflamatórios. Sendo assim, fragmentos de moléculas da MEC (ADAMs, metaloproteinases e colágeno) podem funcionar como biomarcadores promissores na avaliação da atividade doença e pode representar alvos terapêuticos úteis no futuro (Petrey & Carol, 2017).

O epitélio é fundamental para manutenção da saúde intestinal. No entanto, tanto na DC quanto na RCU, a permeabilidade intestinal é prejudicada, o que resulta na invasão de numerosas bactérias, seguida por infiltração de células imunes no intestino e desencadeamento de sintomas intestinais na DII. Nesse contexto, o complexo e-caderina e  $\beta$ -catenina pode exercer um papel importante dentro da fisiopatologia da DC e RCU (Manon-Jensen et al., 2020).

Os ensaios imunoquimiluminescentes apresentam uma elevada sensibilidade (superior aos ensaios espectrofotométricos e fluorimétricos) por permitirem detecção na faixa de femtomoles ou atomoles ( $10^{-15}$  a  $10^{-18}$  mol) com grande estabilidade analítica (Roda, Seidel & Niessner, 2011). Estes ensaios baseiam-se na detecção da emissão de luz, decorrente da reação entre o antígeno e anticorpo marcados por compostos quimiluminescentes, como o éster de acridina (Brown et al., 2009).

Diante do exposto, os ensaios histoquimiluminescentes e imunoistoquímicos para componentes essenciais da matriz, tais como: ADAMs, colágeno, e-caderina e  $\beta$ -catenina em biópsias de pacientes diagnosticados com DII possibilitará a compreensão do papel da MEC na patogênese da DC e da RCU.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Doenças Inflamatórias Intestinais

O trato gastrointestinal (TGI), que se estende da cavidade bucal ao ânus (canal alimentar), e os órgãos anexos (dentes, língua, glândulas salivares, fígado, vesícula biliar e pâncreas) constituem o sistema digestório. As estruturas do TGI incluem: boca, faringe, esôfago estômago, intestino delgado, intestino grosso, reto e ânus. A estrutura histológica geral do canal alimentar é constituída por 4 camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa (Kim, 2017).

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são definidas como processos inflamatórios crônicos, de etiologia multifatorial, que acometem o TGI. Caracterizadas por episódios recorrentes de inflamação intercalados por períodos de acalmia, com ampla variedade de manifestações clínicas (Glassner, Abraham & Quigley, 2020).

A doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa (RCU) representam as principais formas de DII. Apesar de serem doenças com sítios anatômicos distintos, elas compartilham aspectos clínicos e epidemiológicos que sugerem a possibilidade de fatores etiopatogênicos comuns (Glassner, Abraham & Quigley, 2020).

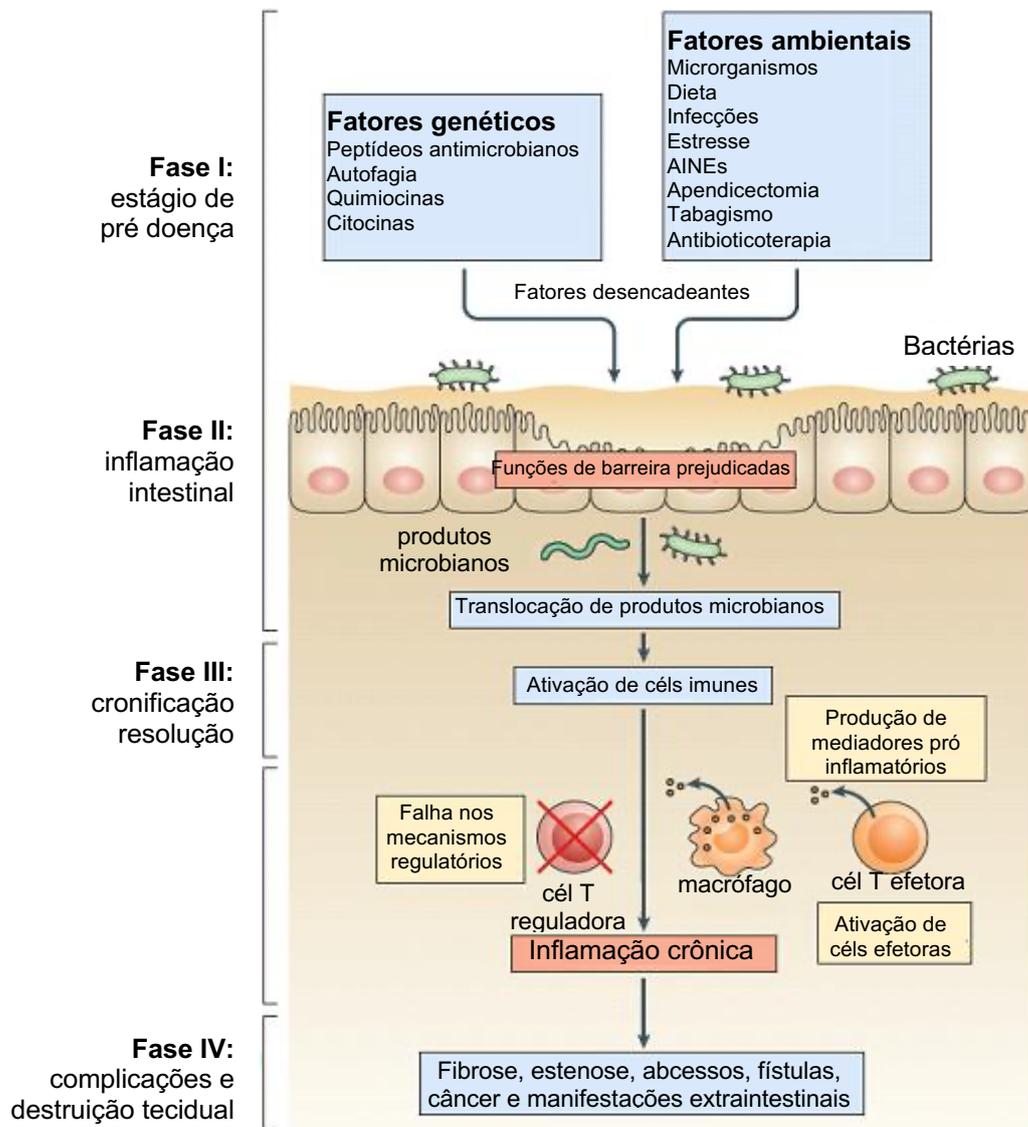
A localização anatômica e o grau de inflamação determinam os sintomas predominantes destas afecções que podem incluir dor abdominal, diarreia e sangramento retal. Frequentemente lesões em regiões como pele, olhos, articulações, pulmão, genitália, fígado, que geram variados sintomas, também são descritos nestas afecções (Yangyang & Rodriguez, 2017).

O desequilíbrio da microbiota comensal entérica (Glassner, Abraham & Quigley, 2020), a desregulação do aparato imunológico da mucosa intestinal e a suscetibilidade a mutações genéticas nos genes *nucleotide-binding oligomerization domain containing 2* (NOD2) e *toll-like receptors* (TLR) também são fatores contributivos para patogênese das DII (Graham & Xavier, 2020).

O desenvolvimento das DII (Figura 1) é atribuído à ação de diversos fatores ambientais relacionados principalmente a adoção de dietas ocidentais, tabagismo, estresse e até mesmo a melhorias nas condições de higiene e de armazenamento de alimentos que reduzem significativamente a frequência de infecções entéricas (Caruso, Bernard & Núñez, 2020). Tem-se que a exposição a microrganismos durante

as primeiras fases da vida confere uma proteção contra o desenvolvimento de autoimunidade em fases mais tardias (Lavelle & Sokol, 2020).

Figura 1. Quadro conceitual da patogênese das DII



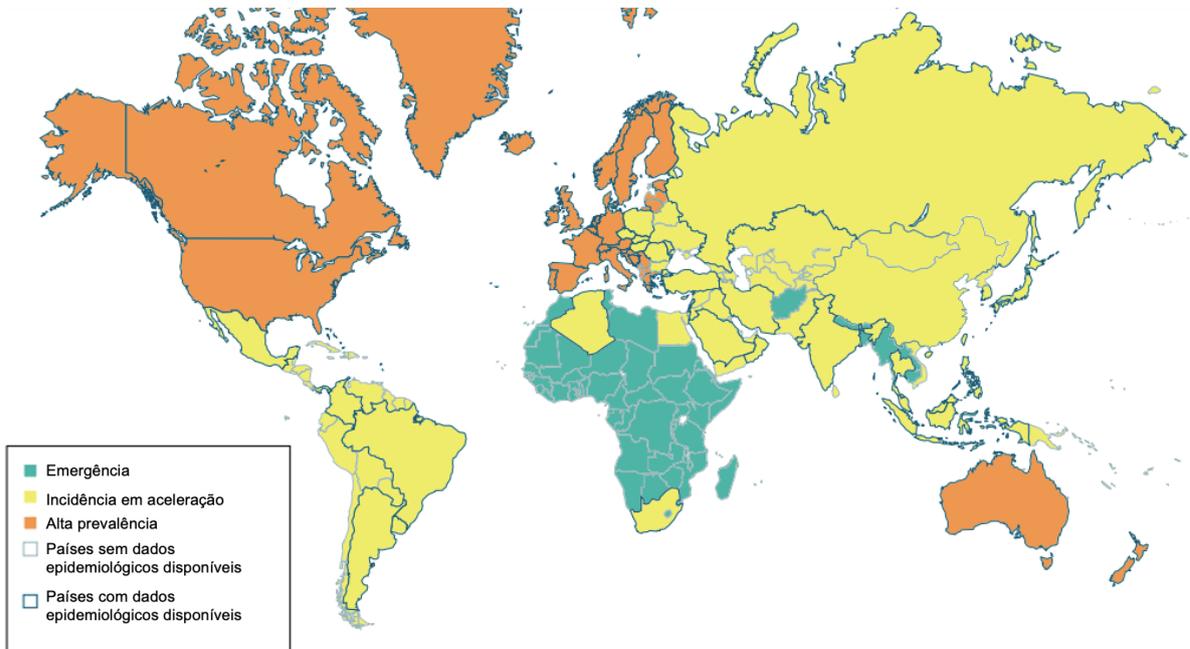
Fonte: Adaptado de Neurath, 2014.

As DII afetam indivíduos de diversas partes do mundo (Figura 2). As taxas de incidência variam de 3,1 a 20,2 casos novos por 100.000 habitantes por ano para a DC e 2,2 a 19,2 por 100.000 habitantes para RCU (Kaplan & Windsor, 2021).

A prevalência é de mais de 200 casos por 100.000 habitantes no Ocidente. América do Norte, Inglaterra, Escandinávia e países da Região do Norte da Europa são classificadas como áreas com altos índices de DII, Sul da Europa, África do Sul,

Austrália e Nova Zelândia são as regiões de incidência intermediária e na Ásia e América do Sul são considerados como regiões com incidência em crescente aceleração (Kaplan & Windsor, 2021).

Figura 2: Mapa epidemiológico global da evolução da DII em 2020.



Fonte: Adaptado de Kaplan & Windsor, 2021.

Na virada do século XXI, a doença inflamatória intestinal tornou-se uma doença global, com incidência acelerada em países recém-industrializados, incluindo o Brasil. (Kaplan & Windsor, 2021).

Nos Estados Unidos, cerca de 1,4 milhões de pessoas apresentam uma das formas de DII na Europa 2,2 milhões e no Canadá cerca de 150 mil pessoas. Importantes trabalhos retrospectivos demonstraram que está havendo uma tendência mundial para o aumento da incidência da DC no mundo, incluindo o Brasil, embora ainda não existam estudos epidemiológicos concretos (Mak et al., 2020; Gasparini, Sasaki & Saad-Hossne, 2018; Quaresma, Kaplan & Kotze, 2019).

Segundo o DATASUS, no Brasil entre janeiro de 2008 e maio de 2021 houveram 57.418 internações com 1452 mortes relacionadas as doenças inflamatórias intestinais. Na região nordeste, neste mesmo período, 11.116 internações foram relatadas, sendo 3.562 casos no estado de Pernambuco.

Existe uma predominância das DII em pessoas caucasianas. A faixa etária mais susceptível compreende indivíduos de vinte a quarenta anos. Não há predominância de sexo, mas uma possível associação com grupos étnicos específicos (Greuter et al., 2020). A diferenciação entre incidência e prevalência, de acordo com a base étnica, localização urbana e rural da população, também é descrita. Estudos epidemiológicos têm consistentemente documentado maior incidência na população dos judeus *ashkenasi* do que na população não judaica. Prevalece, ainda, em moradores de áreas urbanas, pessoas de classes econômicas mais altas, fumantes e parentes de primeiro grau de indivíduos acometidos por DII (Benchimol et al., 2014; Jairath & Feagan, 2020).

Um outro aspecto relevante é o aumento da incidência de DII em países cujas condições socioeconômicas vêm sendo melhoradas, como, por exemplo, em países da América Latina indicando uma forte influência ambiental na patogênese das DII (Gasparini, Sasaki & Saad-Hossne, 2018).

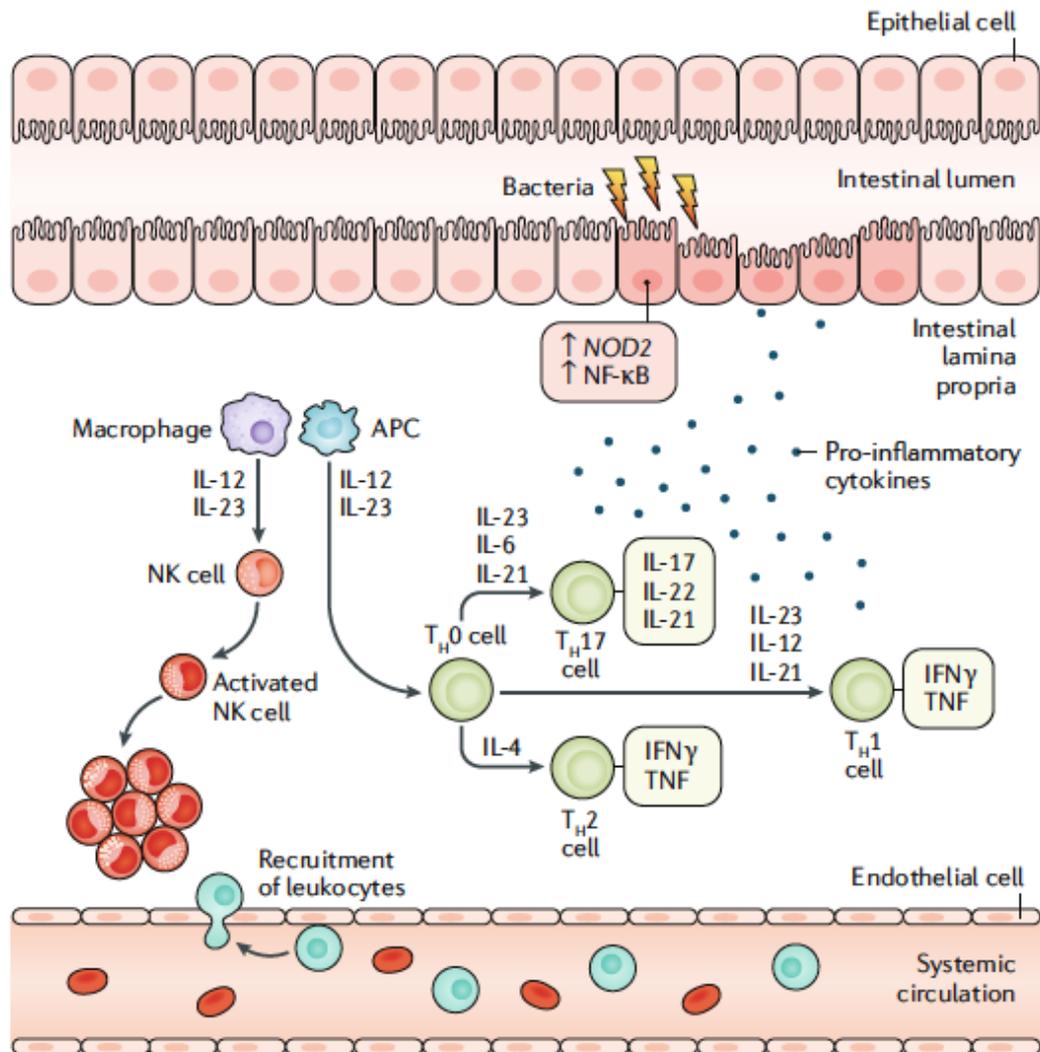
A DC e a RCU foram consideradas raras nos países da América do Sul, porém estudos recentes apresentaram um aumento significativo da incidência destas doenças na literatura. No meio clínico, estas doenças não são consideradas de notificação compulsória, o que nos leva a conjecturar que as DII podem não estar sendo diagnosticadas corretamente. Uma vez que os prontuários médicos registram altas taxas de diarreias de etiologia bacteriana ou parasitária (Quaresma, Kaplan & Kotze, 2019).

### 2.1.1 Doença de Crohn

A doença de Crohn (DC) constitui uma desordem descontínua e transmural. Inicialmente, é caracterizada por inflamação superficial com formação de estreitamentos fibroestenotantes e transpassando a parede intestinal, que posteriormente evolui para a formação de fístulas (Roda et al., 2020).

O processo inflamatório na DC é subsequente a uma resposta imunológica exacerbada e mediada pelos linfócitos T auxiliar 1 (Th1) e T auxiliar 17 (Th17), levando à produção de diversas citocinas inflamatórias, incluindo IFN- $\gamma$  (interferon gama), interleucinas (IL) 6, 17A, 17F, 21, 22 e TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa), que desencadeiam o processo inflamatório e uma série de sinais e sintomas clínicos (Figura 3) (Friedrich, Pohin & Powrie, 2019; Neurath, 2014).

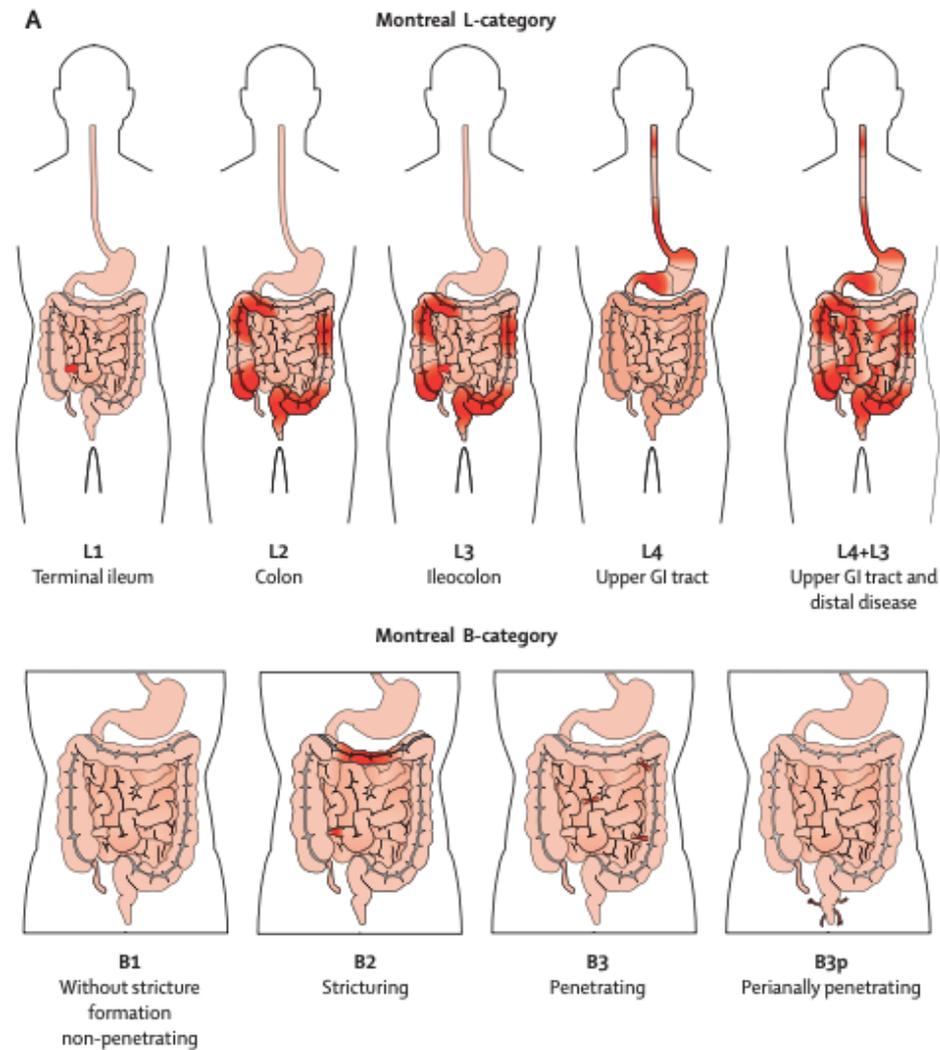
Figura 3: Fisiopatologia da doença de Crohn



Fonte: Roda et. al., 2020.

A DC pode acometer qualquer porção do trato gastrointestinal de forma uni ou multifocal, sendo considerada uma manifestação heterogênea, de caráter multifatorial (Figura 4). Uma vez que o diagnóstico da doença de Crohn seja estabelecido, os pacientes devem ser fenotipados de acordo com a classificação de Montreal e rastreados para manifestações extra-intestinais ou doenças autoimunes associadas. Uma avaliação da atividade da doença em combinação com fenótipo e características endoscópicas ajuda a estratificar os pacientes e permite a escolha do melhor regime terapêutico, uma vez que esses fatores são importantes preditores do curso da doença e suas possíveis complicações (Gajendran et al., 2018).

Figura 4: Localização anatômica e fenótipos das lesões na doença de Crohn



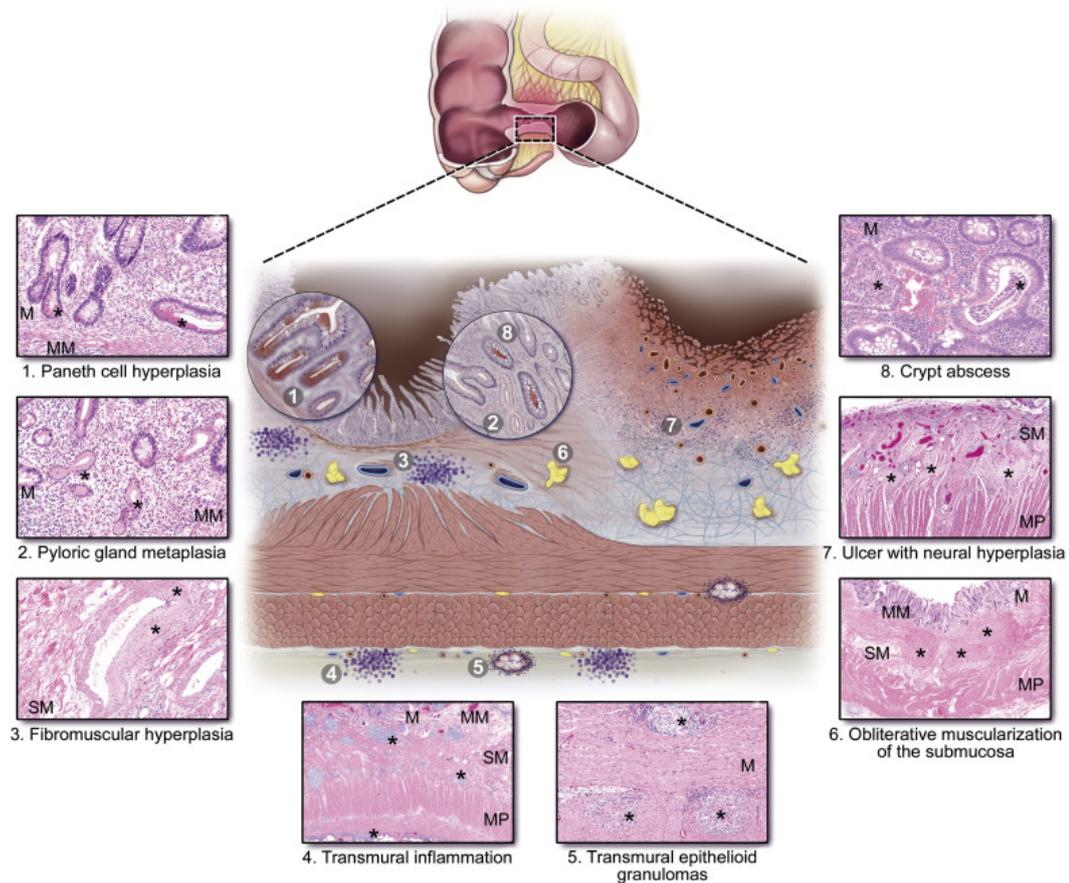
Fonte: Gajendran et al., 2018.

A válvula ileocecal é acometida mais frequentemente, seguida das porções distais do íleo terminal, do segmento do intestino delgado e do cólon ascendente. Macroscopicamente, notam-se áreas hiperêmicas permeadas por áreas de exsudação na serosa. A mucosa exhibe úlceras aftóides que podem evoluir para úlceras hemorrágicas, serpiginosas ou lineares (Roda et al., 2020; Feuerstein & Cheifetz, 2017).

Microscopicamente na DC, podem-se observar alterações na arquitetura de vilosidades e criptas e metaplasia pilórica. Os achados histopatológicos mais comuns incluem: hiperplasia das células de Paneth, metaplasia das glândulas pilóricas, hiperplasia fibromuscular, inflamação transmural, presença de granulomas, abscesso

das criptas, lesões ulcerosas e muscularização obliterativa da submucosa (Figura 5) (Gordon et al., 2020).

Figura 5: Aspectos histopatológicos gerais da doença de Crohn



Fonte: Gordon et al., 2020.

Na mucosa há aumento do infiltrado inflamatório linfoplasmocitário, além de macrófagos, eosinófilos e neutrófilos que se estendem da mucosa até a serosa (Roda et al., 2020). Os neutrófilos, durante a fase ativa da doença, agredem o epitélio glandular ocasionando as criptites ou formando microabscessos (Conrad et al., 2019; Schofield & Haboubi, 2020).

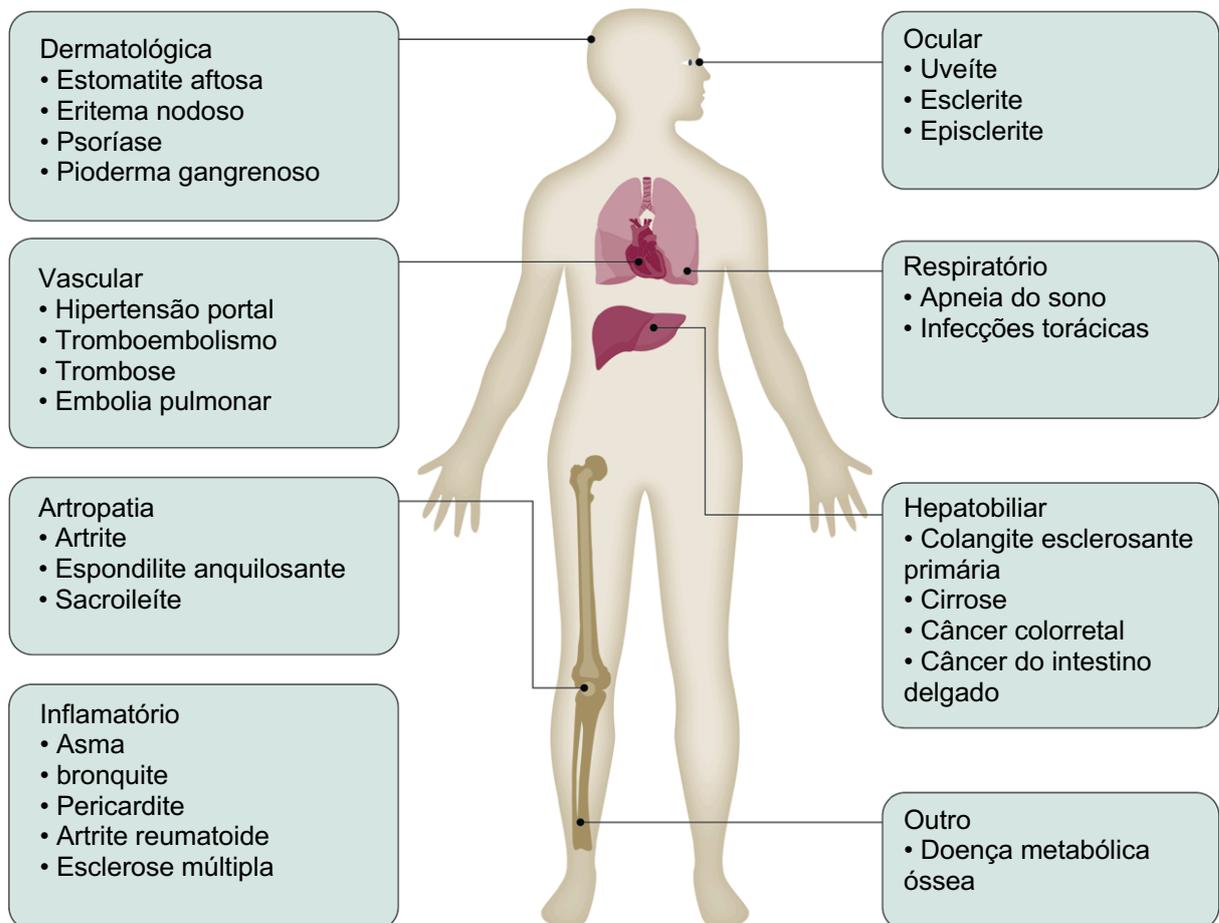
Em estenoses associadas a DC, as áreas de fibrose submucosa são pronunciadas e acompanhadas por hiperplasia da mucosa, que fica espessa. Além da hiperplasia, a camada muscular exibe fibras desordem e deposição excessiva de matriz extracelular. Dentro da submucosa, nervos hipertróficos estão frequentemente presentes, e artérias e veias podem mostrar hiperplasia fibromuscular. O envoltório de gordura, ou *“fat wrapping”*, presente no mesentérico e estendendo-se ao longo da

borda anti-mesentérica do intestino é uma importante característica patológica frequentemente associada a estenose do intestino delgado (Gordon et al., 2020).

Os sinais e sintomas clínicos variam de acordo com o fenótipo (inflamatório, fistulizante ou estenosante) apresentado pelo paciente e incluem diarreia intermitente, dor abdominal, perda ponderal e sangramento retal. Estes fenótipos são determinados pela localização, extensão e severidade do padrão inflamatório, que tendem a permanecer constantes ao longo da vida do paciente diagnosticado e tratado precocemente (Roda et al., 2020; Schofield & Haboubi, 2020).

Existe uma grande prevalência de manifestações extraintestinais (Figura 6), podendo ocorrer alterações cutâneas, renais, circulatórias, oculares, articulares e neoplásicas, tais como: uveíte, poliartrite migratória, sacroileíte, espondilite anquilosante, eritema nodoso, baqueteamento digital, adenocarcinoma intestinal (Marotto et al., 2020).

Figura 6: Manifestações extraintestinais na doença de Crohn



Fonte: Adaptado de Roda et. al., 2020.

As metas do tratamento da DC incluem a indução e a cicatrização da mucosa. A escolha da terapia é fundamentada em estudos que avaliam a heterogeneidade dos segmentos do trato gastrointestinal envolvidos, o padrão da doença, a severidade dos sintomas apresentados e a resposta a terapias anteriores (Ho et al., 2006). As opções terapêuticas incluem terapia biológica (fármacos anti-TNF e anti-integrinas), imunossuppressores, antimicrobianos e glicorticoide. Usualmente as diretrizes preconizam uma abordagem farmacológica com utilização inicial de terapias menos tóxicas e resguardando as terapias com maior risco de toxicidade para os pacientes mais refratários (Sulz et al., 2020).

As ressecções cirúrgicas ou enteroplastias, apesar de proporcionarem alívio imediato das complicações como estreitamentos e fístulas, não constituem um recurso curativo por ser comum a recorrência pós cirúrgica. Sendo assim, um recurso reservado aos casos de intratabilidade clínica ou doença refratária (Sulz et al., 2020).

### 2.1.2 Retocolite Ulcerativa

A retocolite ulcerativa (RCU) acomete a mucosa colorretal, raramente incluindo o íleo terminal. Ao contrário da doença de Crohn, a RCU normalmente não afeta a espessura completa da parede intestinal, permanecendo restrita à mucosa (Figura 7). O padrão inflamatório tende a ser simétrico, contínuo e difuso, não havendo mucosa sadia intercalando as lesões (Taku et al., 2020).

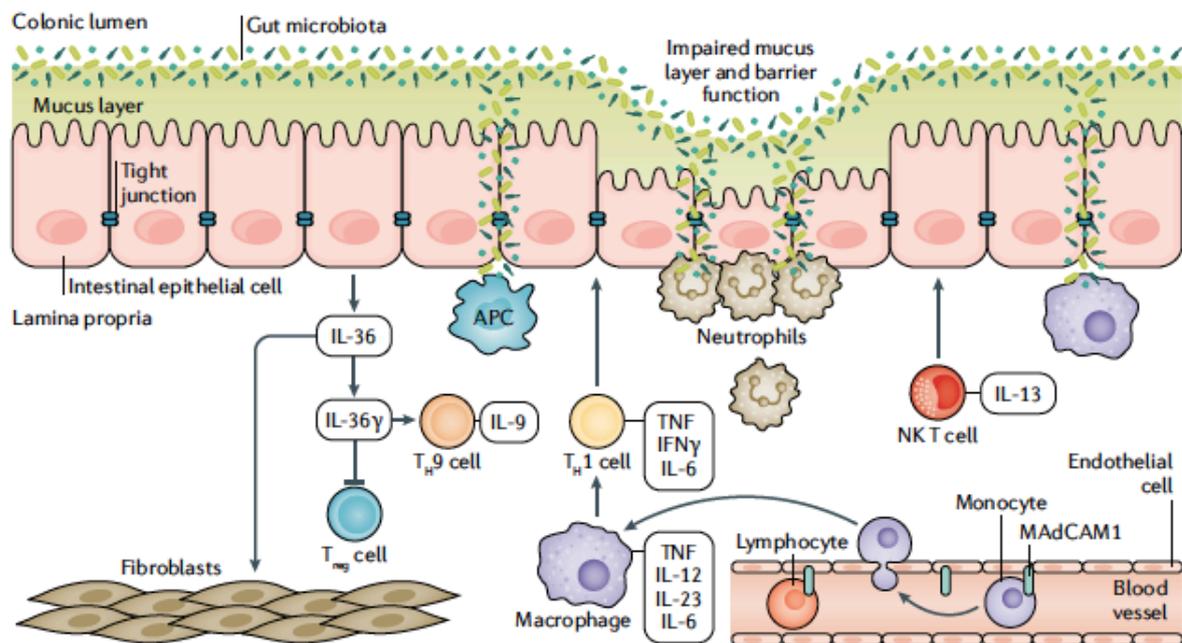
Figura 7: Localização anatômica das lesões na retocolite ulcerativa



Fonte: Adaptado de Baghaei et.al., 2019.

A resposta imunológica é dependente da ativação dos linfócitos T auxiliar 2 (Th2) e T auxiliar 17 (Th17), interleucinas (IL) 4, 5, 6, 13, 17, 21, 22, e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e mediada por células especializadas, tais como células *natural killer* (NK) (Figura 8). Este padrão celular é responsável pela citotoxicidade das células epiteliais na RCU (Friedrich, Pohin & Powrie, 2019; Neurath, 2014).

Figura 8: Fisiopatologia da retocolite ulcerativa

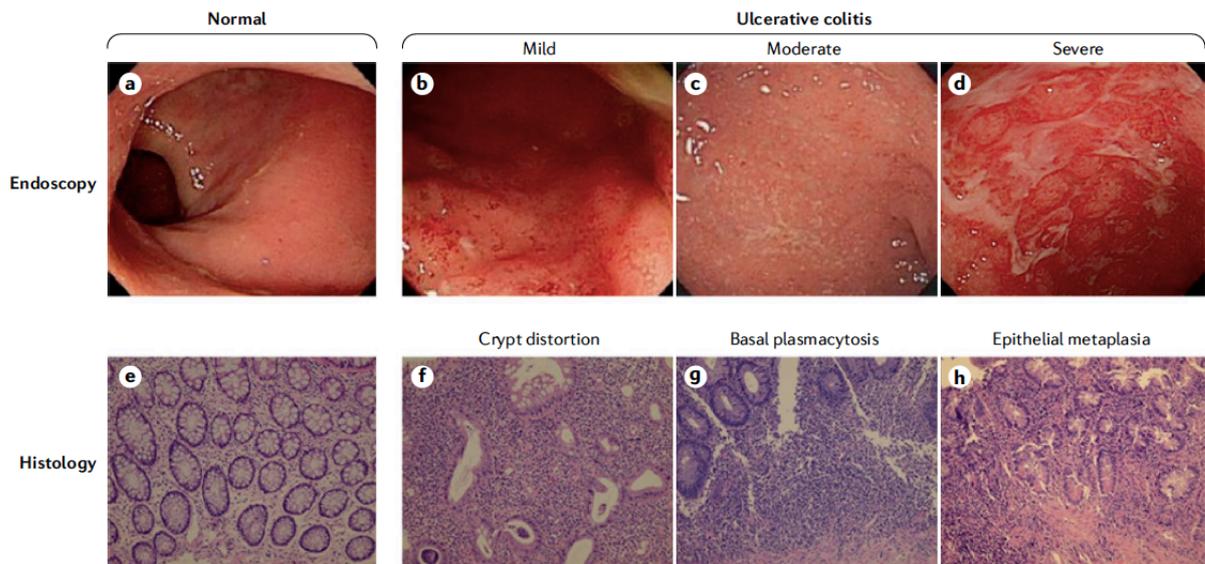


Fonte: Adaptado de Taku et al., 2020.

A serosa não exibe alterações. Contudo, a mucosa exibe aparência hemorrágica, eritematosa e granular. As úlceras, quando presentes, são superficiais. Outro aspecto relevante é a presença de pseudopólipos frequentemente localizados no cólon e no sigmoide (Taku et al., 2020; Feuerstein & Cheifetz, 2017).

Histologicamente, nota-se a presença de distorção arquitetural das criptas e, eventualmente, está associada a presença de criptites e por aglomerados de neutrófilos no lúmen das criptas, os chamados abscessos crípticos (Figura 9). O infiltrado inflamatório exibe plasmocitose basal (Papi et al., 2013). Outras características incluem aumento de celularidade da lâmina própria, metaplasia das células de Paneth, depleção de muco, edema e atrofia da mucosa, congestão vascular e hemorragia focal (Conrad et al., 2019; Rosenberg et al., 2013; Yantiss & Odze, 2006).

Figura 9: Aspectos endoscópicos e histológicos da retocolite ulcerativa



Fonte: Adaptado de Taku et.al., 2020.

Os sintomas variam de acordo com a área comprometida e o grau de intensidade do processo inflamatório e incluem febre, inapetência, perda de peso e anemia. Do ponto de vista clínico, presença de sangue nas fezes é a queixa mais recorrente de pacientes com RCU associada com outros sintomas como diarreia, tenesmo, urgência evacuatória e dor abdominal (Hazel & O'Connor, 2020).

Assim como na DC, a RCU também apresenta manifestações extraintestinais durante a doença ativa, neste contexto citam-se as artrites periféricas, eritema nodoso, aftas orais e episclerite como as principais afecções relatadas (Algaba et al., 2021).

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

Pacientes com RCU têm risco aumentado de desenvolver câncer colorretal quando comparado à população geral. O risco relativo é estimado em 2,75, ou seja, cerca de 20% dos pacientes poderão desenvolver câncer. Este risco é proporcional à extensão e gravidade da lesão, ao tempo da doença e ao histórico familiar de câncer do cólon. Cabe ressaltar, que pacientes com DC com comprometimento do cólon

apresentam os mesmos riscos que pacientes com RCU (Rabbenou & Ullman, 2020). A carcinogênese é atribuída a ativação prolongada das vias de sinalização responsáveis pela renovação celular constituem fatores determinantes para formação de lesões pré-malignas (Campos-Silva et al., 2020).

Os segmentos farmacoterapêuticos de escolha para o tratamento da RCU se baseiam no uso de medicamentos anti-inflamatórios, imunossupressores e antimicrobianos. Outras propostas terapêuticas abrangem o uso de probióticos com a finalidade de restaurar o equilíbrio da microbiota entérica e oxigenoterapia hiperbárica para o tratamento das complicações fistulizantes (Kayal & Shah, 2020).

A principal indicação de cirurgia eletiva inclui pacientes com quadro clínico não responsivo ao tratamento medicamentoso, pacientes com interferência direta na qualidade de vida e aqueles cuja sintomatologia só poderia ser controlada com tratamentos em longo prazo e com efeitos colaterais excessivos. O tratamento cirúrgico da RCU, diferentemente da DC, tende a ser curativo (Kayal & Shah, 2020).

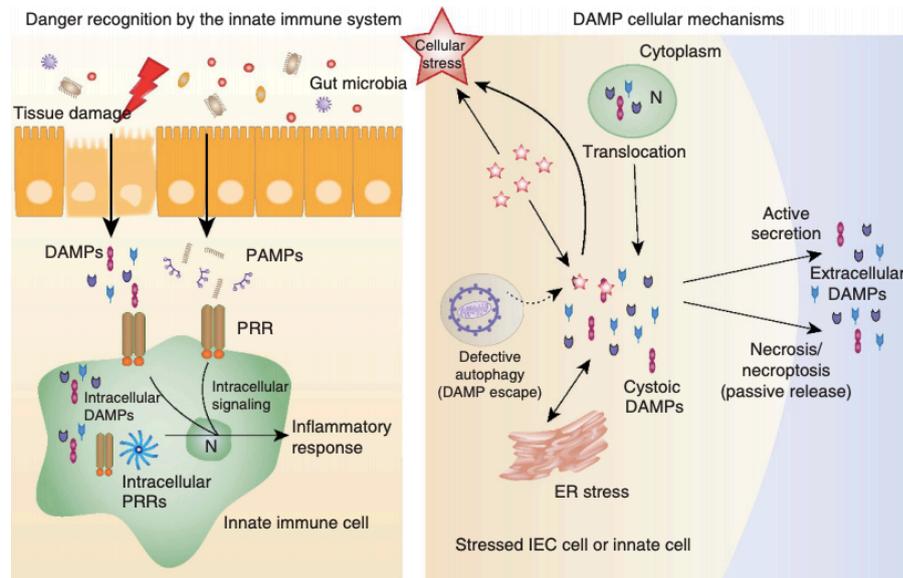
## 2.2 Matriz Extracelular e as DII

A matriz extracelular (MEC) é uma complexa e dinâmica coleção de glicoproteínas, proteínas e glicosaminoglicanos (GAG), que compreende o ambiente externo de cada célula, controlando a estrutura, a organização e a hidratação de todos os tecidos, além de ser fundamental nos processos de lesão e reparo tecidual (Petrey & Carol, 2017).

O tecido conectivo que compõe a MEC apresenta funções muito além do preenchimento dos espaços entre as células. Esta matriz fornece elementos essenciais que compõem uma variedade de mecanismos mecânicos, incluindo a interação com mecânica receptores, por exemplo, atuando como um reservatório para fatores de crescimento e citocinas e fornecendo um ambiente que facilita a troca e a eliminação de nutrientes (Petrey & Carol, 2017).

A estrutura da MEC durante um processo patológico é alterada pela modificação na expressão e na ativação de enzimas modificadoras de matriz. A destruição tecidual que ocorre durante um processo inflamatório é mediada pelas metaloproteinases (MMPs), derivadas de leucócitos (Figura 10). Os produtos de degradação da MEC são considerados DAMPs, que são reconhecidos por receptores Toll-like e acionam as respostas imunológicas (Al-Ghadban et al., 2016).

Figura 10: Reconhecimento do dano pelo sistema imune inato e a resposta inflamatória associada



Fonte: Adaptado de Boyapati et.al., 2016.

Embora a função de muitos fragmentos da MEC ainda precisa ser investigada diretamente nas DII, níveis circulantes dos neoepítopos de colágeno, laminina e vimentina correlacionam-se com subtipos de DII, e podem ser úteis para discriminar retocolite ulcerativa da doença de Crohn (Holmberg et al., 2018).

O epitélio intestinal se conecta a matriz através da membrana basal, que é uma estrutura rica em elementos estruturais, principalmente colágenos. A arquitetura da membrana basal, consiste em uma estrutura filamentosa densa com numerosos, dinamicamente fenestrações remodeladas que facilitam a água e transporte de nutrientes, bem como conexões entre células acima e abaixo da membrana basal. O epitélio intestinal representa um mecanismo de barreira física que evita a infecção da mucosa subjacente tecido (Moriggi et al., 2018).

A regeneração da barreira intestinal é baseada na proliferação de células-tronco intestinais, que estão localizadas na base das criptas. Onde as células progenitoras sofrem rápida proliferação antes da diferenciação. Após a diferenciação, as células migram ao longo do eixo cripta-vilosidade ao topo das criptas (cólon) ou às pontas das vilosidades (intestino delgado), respectivamente. Após aproximadamente 34 dias, as células do tecido epitelial intestinal sofrem apoptose e são eliminadas no lúmen intestinal. Curiosamente, vários defeitos nas etapas de diferenciação distintas

foram encontrados para causar disfunção da barreira levando a inflamação intestinal e até mesmo processos neoplásicos malignos (Sina, Kemper & Derer, 2018).

Os mecanismos de regulação mais conhecidos de descamação epitelial envolvem recorte da matriz da membrana basal através de aumento da expressão e ativação de MMPs. Estudos recentes mostraram que MMP9 aumenta permeabilidade, aumenta a apoptose epitelial e promove perda de células caliciformes durante a retocolite (Goffin et al., 2016).

A submucosa é uma densa rede de tecido conectivo formada por fibroblastos, músculo liso, células, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos. A MEC da submucosa consiste em um arranjo de fibras de colágeno diagonais que fornecem a flexibilidade essencial necessária durante o peristaltismo (Petrey & Carol, 2017).

Os principais subtipos de colágeno no normal tecidos são tipo I (70%), tipo III (20%) e tipo V (12%). No entanto, durante a inflamação, células se infiltram na submucosa, onde podem liberar enzimas que degradam a matriz e iniciam um ciclo de degradação e síntese de novos componentes da MEC. A inflamação crônica leva a alterações na composição celular e molecular da submucosa (Petrey & Carol, 2017).

O tecido de pacientes com DII é caracterizado por um aumento no colágeno total, bem como aumentos no colágeno tipo III e V, que podem contribuir significativamente para o enrijecimento da MEC. Os produtos de degradação do colágeno produzidos por MMPs são liberados nas redondezas tecido, onde esses fragmentos de MEC atuam como quimiocinas, capazes de aumentar o recrutamento de neutrófilos (Goffin et al., 2016).

A fibronectina é outro componente da MEC na submucosa que regula o comportamento celular responsável pelas interações célula-matriz. Além de promover a migração e a proliferação de fibroblastos a partir do aumento da biodisponibilidade de TGF- $\beta$ . A fibronectina também se liga ao TNF- $\alpha$ , que promove a quimiotaxia e a expressão de MMP9 em monócitos. Em DII, deposição de fibronectina é aumentada nos pacientes com lesões na submucosa (Burke et al., 2008).

Em comparação com controles saudáveis, as células musculares lisas intestinais e fibroblastos produzem níveis aumentados de ácido hialurônico em tecidos com DII. Modelos murinos de colite demonstrara que a deposição desse glicosamicoglicano não sulfatado compreende um evento precoce na inflamação tecido intestinal, precedendo e promovendo leucócitos infiltração, desempenhando um papel crucial na condução da inflamação (Kessler et al., 2008).

### 2.3 Biomoléculas relacionadas as DII

Os marcadores laboratoriais clássicos de atividade inflamatória como VHS (velocidade de hemossedimentação), PCR (proteína C reativa), contagem de plaquetas e leucócitos, hemoglobina, ferro sérico, e albumina são utilizados para o acompanhamento de DII (Chen et al., 2020). Geralmente, na doença ativa ocorre aumento do número de leucócitos, mas o uso de corticoide, medida terapêutica frequentemente necessária nestes casos, pode ser responsável por este aumento. Portanto, os parâmetros acima descritos são inespecíficos para a DII ativa o que impossibilita a utilização como marcadores patognomônicos na prática clínica (Boden et al., 2018; Kessel et al., 2021).

A colonoscopia com biópsia é descrita como melhor método para avaliar a inflamação, sua localização, extensão e gravidade. Neste cenário ainda indefinido de real avaliação da atividade inflamatória, pesquisadores têm buscado outros marcadores como fator de crescimento endotelial (EGF), fatores de coagulação e a IL-6 que possam estar ligados à inflamação (Kessel et al., 2021; Nanini et al., 2018).

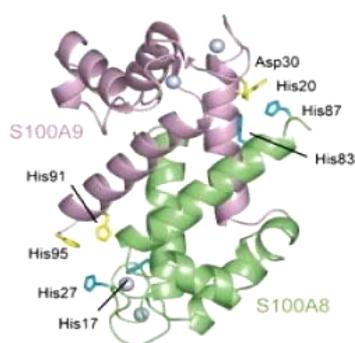
Proteínas de grânulos de neutrófilos têm sido marcadas e estudadas como indicadores de inflamação do trato gastrointestinal, incluindo calprotectina, lactoferrina, elastase de polimorfonucleares, lisozima, entre outras moléculas (Khaki-Khatibi et al., 2020). Estes biomarcadores de atividade inflamatória têm mostrado resultados promissores como ferramentas de diagnóstico e acompanhamento das enfermidades intestinais por não estarem elevados em condições inflamatórias extraintestinais, constituindo assim indicadores de lesão gastrointestinal (Khatibi et al., 2020; Fukunaga et al., 2018).

Alguns estudos têm comparado principalmente calprotectina e lactoferrina com avaliação colonoscópica e histológica na verificação da inflamação intestinal em pacientes com DII (Johnson, White & Schmidt, 2020; Guardiola et al., 2014). Outros autores demonstraram que os índices destas proteínas eram significativamente maiores em amostras de pacientes com doença ativa quando comparados com doença inativa, correlacionando-os aos índices de atividade CDAI (do inglês *Crohn's Disease Activity Index*) e UCAI (do inglês *Ulcerative Colitis Activity Index*). Os resultados destes estudos são promissores, mostrando que estes marcadores são úteis para detectar a inflamação (Burri et al., 2013; D'Inca et al., 2007; García-Sánchez et al., 2010), diferenciar de outras afecções intestinais (Limburg et al., 2000; Sydora

M, Sydora B & Fedorak, 2012), além de predizer a recidiva (Guidi et al., 2014; Lasson et al., 2014; Naismith et al., 2014).

A calprotectina é uma proteína ligante de cálcio e zinco da família S-100 formada pelas subunidades S100A8 e S100A9 (Figura 11), expressa no citosol de neutrófilos, que apresenta funções imunorreguladoras (Khaki-Khatibi et al., 2020). Trata-se de um componente da resposta imune inata, que está diretamente associado à indução da apoptose, ao recrutamento de monócitos e inibição da proliferação celular e é liberado em consequência da ruptura celular. A calprotectina também apresenta ação microbicida através da inibição local de metaloproteínases dependentes do zinco (Smith & Gaya, 2012).

Figura 11. Estrutura molecular da calprotectina



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

Por se tratar de uma proteína amplamente expressa em neutrófilos, a calprotectina se relaciona muito bem com a análise histopatológica, pois reflete as condições de migração leucocitária possibilitando consequentemente a avaliação do grau e o tipo de inflamação estabelecida (Krzystek-Korpacka et al., 2020).

Em processos infecciosos os níveis plasmáticos da calprotectina aumentam significativamente, podendo ser detectados na urina, saliva, plasma, líquido cefalorraquidiano e em biópsias. Existe uma correlação significativa entre a excreção calprotectina e à gravidade da inflamação, extensão e à combinação de ambos (Bromke et al., 2021).

Níveis altos de calprotectina em pacientes com DII são resultantes do aumento da infiltração de neutrófilos na mucosa intestinal e a transmigração para o lúmen intestinal. Outras proteínas derivadas de neutrófilos como elastase, mieloperoxidase, lisozima parecem ter potencial como marcadores de inflamação gastrointestinal.

Contudo, a calprotectina apresenta vantagem sob estas por representar 60% da proteína do citosol de neutrófilo (Zhou & Liu, 2017).

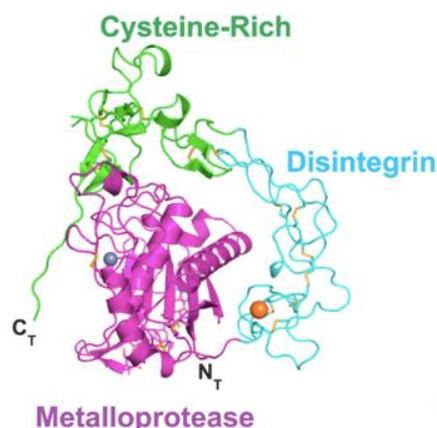
A concentração de calprotectina em adultos saudáveis já foi bem estabelecida em vários estudos demonstrando um valor médio ao redor de 25mg/Kg. Sendo, os valores acima de 50 mg/Kg considerados anormais (Viola et al., 2020). Porém em pacientes com DII ativa, estudos tem demonstrado valores variando de 200mg/Kg a 20.000mg/Kg, estes achados sustentam a hipótese de que o aumento da calprotectina seja resultado da migração de neutrófilos da mucosa inflamada para o lúmen intestinal (Lee et al., 2021).

## 2.4 ADAM 10

As proteínas ADAM, que compreendem a associação de um domínio desintegrina e outro metaloprotease, são uma família de mais de 30 proteases glicosiladas ancoradas à membrana, dependentes de zinco ( $Zn^{2+}$ ) que estão envolvidas em processos relacionados à interface célula-célula, célula-matriz extracelular e secreção de TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral  $\alpha$ ), um importante imunomodulador (Saha et al., 2019).

A ADAM10 (Figura 12) é uma enzima de processamento de TNF que cliva o pro-TNF, uma proteína precursora ligada à membrana, além de estar associada a modificação proteolítica de componentes da superfície celular e da MEC. Além de seu homólogo estrutural a ADAM17, essa proteína é uma das mais estudadas da família ADAM (Seegar et al., 2017).

Figura 12: Estrutura molecular da ADAM10



Fonte: Adaptado de Seegar et al., 2017

A modificação proteolítica da ADAM10 está relacionada com a capacidade de eliminação uma infinidade de substratos. Entre estes estão moléculas de adesão celular, como por exemplo as caderinas. Para a maioria desses substratos, a eliminação mediada por ADAM10 é um pré-requisito para a ocorrência subsequente da proteólise (Wetzel, Seipold & Saftig, 2017).

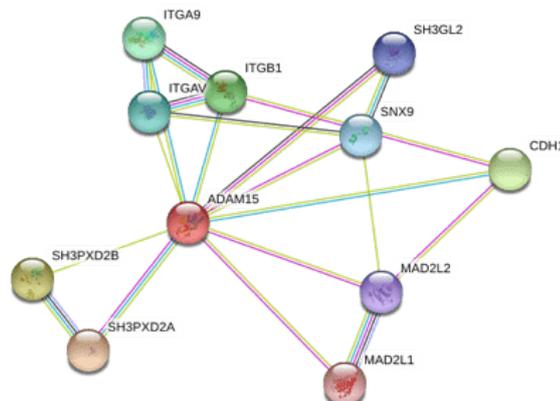
A atividade de ADAM10 é regulado por uma série de mecanismos diferentes, incluindo controle transcricional e translacional. A região promotora de ADAM10 contém vários locais de ligação de fator de transcrição que podem estimular sua transcrição. Estes incluem sítios de ligação para transcrição fatores SP1 e USF, e a proteína de ligação X-box (XBP) -1, bem como um elemento responsivo ao ácido retinóico (Saha et al., 2019).

Desregulação na atividade ADAM10 vem sendo associada a processos patológicos em diferentes doenças humanas, incluindo diversos distúrbios autoimunes e neoplásicos. O papel central do ADAM10 nessas doenças revela a potência da administração de fármacos direcionadas a ADAM10 como uma opção terapêutica futura (Wetzel, Seipold & Saftig, 2017).

## 2.5 ADAM 15

Os domínios D (sítio da desintegrina) das ADAMs também estão implicados na modulação da adesão celular pela integrina. No caso da ADAM15 (Figura 13), esta modulação vem sendo funcionalmente associado à progressão de alguns cânceres, por desencadear angiogênese e angiomas de células tumorais (Saha et al., 2019).

Figura 13: Interação molecular da ADAM15



Fonte: <https://string-db.org/cgi/network.pl?taskId=uliTPHNt6uFu>

Análises através de transcriptômica indicou que dentro da família ADAM, o mRNA de ADAM15 é regulado positivamente de forma mais proeminente (4 vezes) quando as células endoteliais são expostas ao estresse de cisalhamento fisiológico. Essa indução foi confirmada nas células endoteliais venosas, arteriais e microvasculares e está associada ao aumento da presença da proteína ADAM15 nos lisados celulares (5,6 vezes) e na superfície (3,1 vezes) (Babendreyer et al., 2019).

Funcionalmente, ADAM15 promove a sobrevivência de células endoteliais desafiadas pela depleção do fator de crescimento ou estimulação de TNF. A ausência de ADAM15 em condições estáticas ou de baixo estresse de cisalhamento pode, portanto, levar ao dano endotelial e promover a inflamação (Babendreyer et al., 2019).

Nas neoplasias malignas, foi constatado que a ADAM15 interrompe a ligação da integrina  $\alpha\beta3$  ao seu ligante extracelular, regulando assim a migração e invasão tumoral. Mecanicamente, a interação molecular da ADAM15 com a integrina  $\alpha\beta3$  afrouxa a adesão das células tumorais a matriz extracelular (Toquet et al., 2012).

## 2.6 Complexo e-caderina e $\beta$ -catenina

A monocamada epitelial do intestino é uma barreira seletiva que permite a absorção de nutrientes e eletrólitos, ainda atuando para proteger os compartimentos de tecido subjacentes e componentes celulares do ataque e infiltração por antígenos, bactérias e produtos bacterianos presentes no lúmen. A junção aderente, junto com junções oclusivas e desmossomos, formam um complexo de junção apical que controla a aderência célula a célula epitelial e a função de barreira (Daulagala, Bridges & Kourtidis, 2019).

As junções de adesão estão localizadas na parte apical da membrana plasmática. Um dos principais componentes dessa junção é a caderina epitelial (e-caderina), uma glicoproteína pertencente à família clássica da caderina dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ . O mecanismo de interação célula-célula através da caderina está relacionado com a ligação do componente citoplasmático da e-caderina a p120-catenina. Este complexo proteico pode atuar como um sensor de estresse de adesão mecânica que envia sinais para o citoesqueleto de actina e proteínas associadas à actina que regulam a estrutura integridade da célula (Michael & Yap, 2013).

As cateninas ( $\gamma$ -catenina e  $\beta$ -catenina) são proteínas citoplasmáticas associadas à e-caderina, o mediador principal da adesão célula-célula. A perturbação

em qualquer uma dessas moléculas resulta em alterações na adesão intercelular, diferenciação celular e aumento da migração. O epitélio intestinal é caracterizado por rápida renovação celular com proliferação contínua de células multipotentes dentro das criptas de Lieberkuhn, diferenciação celular, apoptose apical e eliminação luminal. Esses processos são críticos para o desenvolvimento e manutenção da arquitetura e função epitelial intestinal e envolvem a ação do complexo e-caderina e  $\beta$ -catenina (Langer et al., 2019).

Sendo assim as mudanças na expressão dos componentes do complexo e-caderina e  $\beta$ -catenina podem ser observadas nas alterações da integridade epitelial e no processo inflamatório ulceroso na DII (Van Der Giessen et al., 2019).

## 2.7 Ensaios Quimiluminescentes

Os átomos ao absorverem energia, fazem transições entre seus níveis energéticos que são responsáveis pela excitação dos elétrons em orbitais moleculares ocupados de mais alta energia (HOMO, *highest occupied molecular orbitals*) para os orbitais desocupados de mais baixa energia (LUMO, *lowest unoccupied molecular orbitals*). As partículas-ondas que transitam entre os orbitais HOMO e LUMO emitem luz e são chamadas de fótons. O processo de emissão de luz através deste fenômeno é denominado luminescência, que pode ser classificada de acordo com o tipo de estímulo energético em quimiluminescência, fotoluminescência, bioluminescência, sonoluminescência, mecano ou triboluminescência, radioluminescência e termoluminescência (Ma et al., 2017).

A quimiluminescência (QL) é o processo de emissão de luz como produto ou um dos produtos de uma reação química definida pela primeira vez por Wiedemann em 1888. Existe uma diferenciação entre a QL e o fenômeno de emissão de luz devido a um aumento de temperatura, a incandescência, que seria um processo físico, não químico, decorrente da emissão de radiação. Portanto a QL pode ser definida como uma reação fria que envolve a formação de um estado eletrônico excitado a partir de uma complexa sequência reacional altamente exotérmica (Ma et al., 2017; Zhao et al., 2021; Roda, Seidel & Niessner, 2011).

As substâncias quimiluminescentes, tais como lofina, lucigenina, etanodioato de bis, pirogalol, luciferina luminol, isoluminol e os derivados da acridina podem ser detectadas na faixa de femtomoles ou atomoles ( $10^{-15}$  a  $10^{-18}$  mol), com sensibilidade

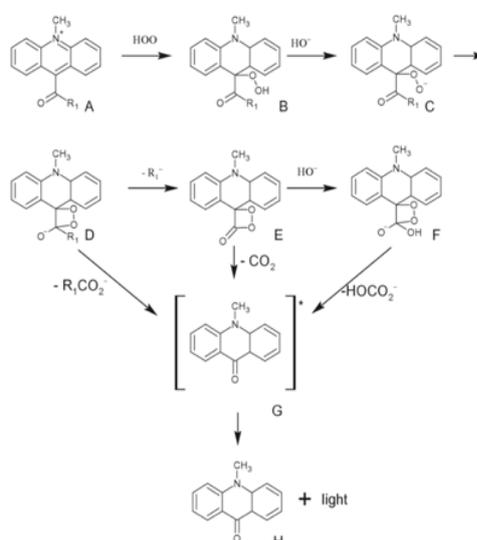
superior aos ensaios espectrofotométricos ( $10^{-6}$  a  $10^{-9}$  mol) e fluorimétricos ( $10^{-9}$  a  $10^{-12}$  mol) (Zhao et al., 2021).

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

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

O mecanismo de QL dos derivados de acridina foi elucidado por Weeks e colaboradores em 1983. O éster de acridina (EA), em especial, oxida rapidamente com o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), devido da adição de íons de hidroperóxido ao anel acridina no carbono 9, seguido por clivagem da ligação éster fenólica (Figura 14). Esta sequência de reações leva a formação de N-metilacridona, que em estado excitado comporta-se como um composto emissor de fótons de curto período (aproximadamente 5 segundos) a 470 nm (Weeks, 1983 *et al.*; Zhao et al., 2021).

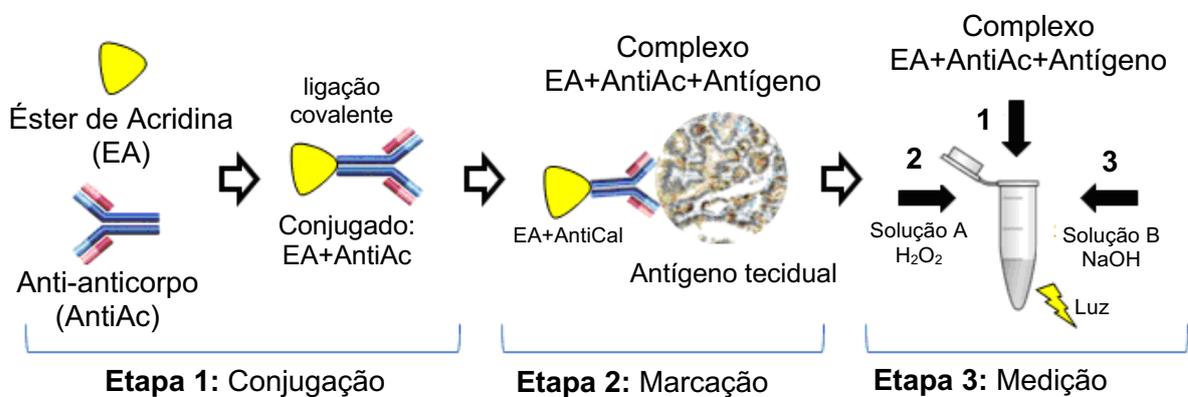
Figura 14: Esquema de reação quimiluminescente dos ésteres derivados de acridina



Fonte: Roda, Seidel & Niessner, 2011

Ensaio imunoquimiluminescente (Figura 15) apresentam elevada sensibilidade e estabilidade analítica. Estes se baseiam na detecção da emissão de luz, decorrente da reação entre o antígeno e anticorpo marcados por compostos quimioluminescente. O EA é capaz de se ligar covalentemente a anticorpos de amostras sorológicas e teciduais, produzindo compostos de alta quimioluminescência, que podem ser captados e quantificados por equipamentos capazes de transformar a luz emitida em impulsos elétricos (Ma et al., 2017; Zhao et al., 2021).

Figura 15: Esquema de ensaio imunoquimiluminescente com éster de acridina



Fonte: Adaptado de Araújo-Filho, 2011

## 2.8 Imunoistoquímica

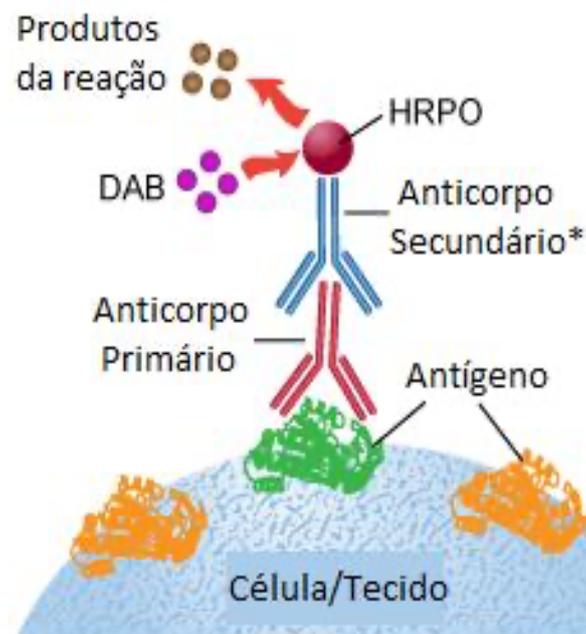
A técnica que utiliza a reação antígeno-anticorpo para a detecção e caracterização de moléculas em tecidos tem sido definida como imunoistoquímica. Sendo assim, a imunoistoquímica compreende um conjunto de metodologias em que se utilizam anticorpos como reagentes específicos capazes de identificar e estabelecer ligação com constituintes teciduais. Esta ligação permite situar e identificar a presença de moléculas específicas em tecidos por intermédio da cor que é associada ao complexo antígeno-anticorpo formado (Torlakovic et al., 2017).

As reações imunoistoquímica podem ser utilizadas na pesquisa médica na elucidação do tecido de origem de neoplasias; na subclassificação de doenças, na pesquisa de fatores prognósticos e terapêuticos; na identificação de estruturas e moléculas secretadas pelas células; entre outras aplicabilidades (Crowe & Yue, 2019).

Os principais métodos aplicáveis a imunoistoquímica compreendem metodologias diretas ou indiretas. O método direto, no qual é utilizado um

anticorpo primário marcado destaca-se por ser uma metodologia simples e rápida, contudo tem como desvantagens, a pouca ampliação de sinal, pois existe somente uma molécula marcada por molécula de antígeno. Enquanto a metodologia indireta (Figura 16), apesar de mais complexa e demorada, é mais sensível, pois há maior número de moléculas marcadas por cada molécula de antígeno. Além de apresentar maior versatilidade e economia quando comparada ao método direto (Torlakovic et al., 2017).

Figura 16: Esquema da reação imunoistoquímica indireta



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

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

A HRP, em presença de peróxido de hidrogênio, forma, numa primeira fase, um complexo enzima-substrato, e, posteriormente, oxida um doador de elétrons que permite a degradação do peróxido em água e oxigênio livre. Alguns doadores de elétrons uma vez oxidados tornam-se coloridos e, portanto, são designados cromógenos. Este fato associado à capacidade de precipitarem no local da reação após a oxidação, permite a identificação e a localização de antígenos. O cromógeno

mais utilizado é a 3,3'-diaminobenzidina-tetrahydroclorato (DAB) que gera um precipitado castanho insolúvel em álcool e em outros solventes orgânicos (Ramos-Vara, 2005).

### 3 JUSTIFICATIVA

Por muitos anos, a presença de doenças inflamatórias intestinais (DII) foi considerada restrita à América do Norte e Europa. Contudo, estudos epidemiológicos demonstraram uma incidência crescente de doença de Crohn (DC) e retocolite ulcerativa (RCU) nas últimas décadas na América do Sul (Ng et al., 2017; Calixto, Flores & Francesconi, 2018).

A DC e a RCU constituem grave problema de saúde, acometem pessoas de qualquer faixa etária, especialmente pessoas jovens, e podem aparecer formas clínicas de bastante gravidade. O curso clínico e os sintomas destas afecções crônicas causam repercussões importantes na qualidade de vida dos pacientes (Vasconcelos et al., 2018).

Diante de sua cronicidade, a pessoa com DII necessita ficar hospitalizada várias vezes e utilizar diversos tratamentos ao longo da vida. Segundo o Datasus, entre janeiro de 2008 a maio de 2021 foram gastos 44.052.618,85 reais com serviços médicos e hospitalares para o tratamento das DII, sendo R\$ 1.617.456,78 só em Pernambuco.

As DII representam um importante problema de saúde pública, já que acometem jovens em fase economicamente produtiva e têm evolução crônica e recidivante (Quaresma, Kaplan & Kotze, 2019).

O diagnóstico precoce e diferencial é a chave para o controle e escolha da terapia farmacológica ideal para remissão da doença, evitando-se cirurgias ou tratamentos desnecessários (Quaresma, Kaplan & Kotze, 2019).

O desenvolvimento de técnicas que possibilitam a análise de proteínas teciduais tais como a imunistoquímica e a histoquimiluminescência, trouxeram também uma renovação de esperanças quanto à possibilidade de obtenção de mais respostas na área das DII. A histoquimiluminescência constitui um recurso de alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico e investigação de diversas doenças a partir das mais variadas amostras biológicas (Basso, Zambom & Plebani, 2014).

A complexa adaptação da MEC durante o processo inflamatório, com alteração nas expressões de metaloproteinases, ADAMs, colágenos, mediadores inflamatórios, fatores de crescimento e moléculas de adesão apresenta-se com um vasto campo a ser explorado para compreensão dos mecanismos fisiopatológicos das DII (Petrey & Carol, 2017).

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Identificar o perfil de imunexpressão das proteínas calprotectina, ADAM 10 e ADAM 15 através de histoquimiluminescência em pacientes com doenças inflamatórias intestinais.

### 4.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o perfil epidemiológico dos pacientes portadores de Doença Inflamatória Intestinal do estudo a partir de análise dos prontuários e questionário.
- Otimizar protocolo histoquimiluminescente para detecção da calprotectina, Adam 10, Adam 15 em biópsias de pacientes com doença de Crohn e retocolite ulcerativa.
- Realizar estudo histopatológico e análise digital das fotomicrografias das amostras histológicas para quantificação do colágeno através das colorações especiais Tricrômico de Masson.
- Identificar a expressão tecidual da calprotectina,  $\beta$ -catenina e e-caderina nas amostras através da imunistoquímica. Posteriormente, determinar, através de histomorfometria, a imunorreatividade da calprotectina.
- Comparar os resultados obtidos nos ensaios imunoquimiluminescente e imunistoquímicos.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Amostras

Foram selecionadas amostras teciduais de 154 pacientes adultos com diagnóstico confirmado de doença de Crohn (n = 49) e retocolite ulcerativa (n = 105), regularmente atendidos no Serviço de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE) no período de março de 2017 a março de 2019 com a prévia autorização e anuência dos responsáveis pelo setor.

O critério de inclusão dos pacientes foi o diagnóstico confirmado de DC ou RCU estabelecido por meio de achados clínicos, radiológicos, endoscópicos e histopatológicos de acordo com os critérios da classificação de Montreal (2012). Todos estes pacientes foram classificados de acordo com a forma anátomoclínica predominante e a fase atividade-doença (ativa ou em remissão).

Como critérios de exclusão foram dispensados aqueles pacientes com colite indeterminada ou que tenham sofrido qualquer processo cirúrgico recente devido a distúrbios gastrointestinais. Também foram excluídos da pesquisa aqueles pacientes que não tiverem nascidos no Brasil.

Como controles foram utilizadas amostras de tecido intestinal (n = 16) de cadáveres do Serviço de Verificação de Óbitos (SVO) também localizado na UFPE. Para o controle, os critérios adotados foram: indivíduos sem alterações gastrintestinais e com tempo de óbito inferior a 24 horas.

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

### 5.2 Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE), CAAE: 63952217.6.0000.5208, sob Ofício nº 1.955.690/2017 CEP/CCS e Registro de Pesquisa CEP/CCS/UFPE nº 222/10 (ANEXO I). As amostras de tecido foram obtidas após a anuência do paciente ou responsável legal através de assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO II).

### 5.3 Aspectos Epidemiológicos

A fim de se estabelecer correlações entre os possíveis agentes causais ou contributivos para as lesões em estudo, os fatores como sexo, faixa etária, localização das lesões, histórico de câncer, hábitos nutricionais, estilo de vida, medicamentos utilizados e outras doenças associadas foram obtidos através da análise dos prontuários dos pacientes e aplicação de questionário (ANEXO III).

### 5.4 Estudo Histopatológico

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

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

### 5.5 Estudo Imunohistoquimiluminescente

A conjugação do éster de acridina (EA) com o anticorpo foi realizada de acordo com o protocolo de conjugação desenvolvido por Weeks et al (1983) e utilizando o kit *Acridinium Ester Labeling Worksheet* (Enzo Life Sciences Catalog nº. ADI-907-001, USA). Para conjugação foram incubados 100  $\mu$ L de cada anticorpo (anti-calprotectina, anti-ADAM10, anti-ADAM15, anti- $\beta$ -catenina e anti-e-caderina) com 1  $\mu$ L da solução de éster de acridina (EA) por 1h a 25° C, sob agitação constante. Para separação do conjugado (anticorpo-EA) dos demais constituintes (anticorpo não conjugado e EA-livre) a amostra foi submetida à cromatografia de exclusão molecular, por meio de uma coluna de Sephadex G-25 (10 x 1 cm) previamente incubada com tampão fosfato sódico (PBS), pH 7,2. Durante a eluição foram coletadas 15 alíquotas de 1 mL.

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

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

A quimiluminescência do conjugado presente nas amostras foi mensurada pelo luminômetro tubo único módulo 9200-001 (Turner BioSystems, USA). Para desencadeamento da quimiluminescência é necessária a adição sequencial de 50 µL de uma solução 0,5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 0,1 N de ácido nítrico (solução A) a 50 µL de amostra seguida de alcalinização rápida do meio a partir da adição de 50µL de NaOH a 0,25 N (solução B). A rápida conversão de derivados de acridina em suas pseudobases após a alcalinização requer cuidado para minimizar o tempo entre a adição do NaOH e a observação da intensidade da emissão de quimiluminescência medida em unidade de luz relativa (ULR).

Para a análise dos tecidos, as lâminas histológicas (0,3x0,3x8x10<sup>-4</sup> 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.

## 5.6 Estudo Imunoistoquímico

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

A recuperação antigênica foi feita com tampão citrato 100 mM pH 6,0 em panela de pressão por 2 minutos após fervura. Posteriormente, as amostras foram resfriadas até 35° C e então incubadas com solução de peróxido de hidrogênio por 30 minutos

em temperatura ambiente para o bloqueio da peroxidase endógena. Posteriormente os tecidos foram incubados com anticorpos (1:200) por 2 horas a 37° C em estufa.

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

### 5.7 Análise Histomorfométrica Digital

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

Os parâmetros morfométricos adotados foram a área média total ( $\mu\text{m}^2$ ), distribuição da área média (em pixels) de colágeno intersticial por campo captado na lâmina histológica (área total do campo = 12.234  $\mu\text{m}^2$ ) e o número de células marcadas por imunistoquímica para os anticorpos avaliados por campo captado na lâmina histológica. A análise quantitativa das células marcadas foi aferida utilizando sistema automático, estudando-se três campos em cada caso. Os *softwares* utilizados para as análises histomorfométricas foram o GIMP (GNU Image Manipulation Program) versão 2.10 (2019) e o ImageJ versão 1.52 (2019).

### 5.8 Análise Estatística

As comparações de distribuição entre variáveis foram realizadas através de métodos paramétricos Anova de fator único, Teste de Tukey e o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Foi considerado indicativo de significância estatística um valor de *P* menor que 0,05. Para estas análises foi utilizado o *software* OriginPro SR4 versão 9.6 (OriginLab Corporation, One Roundhouse Plaza, Northampton, MA 01060 USA).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Artigo 1

#### **Immunochemiluminescent Detection of Calprotectin in Inflammatory Bowel Disease**

**Ana Paula Fernandes da Silva**, Luciano de Albuquerque Mello, Gabriela Ayres Fragoso do Nascimento, Maurílio Toscano de Lucena, Luiz Bezerra Carvalho Júnior, Mario Ribeiro de Melo-Júnior

**Ana Paula Fernandes da Silva, Mario Ribeiro de Melo-Júnior**

Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde and Departamento de Patologia da UFPE, Av. da Engenharia - Cidade Universitária, Recife - PE, 50670-420

**Luciano de Albuquerque Mello, Maurílio Toscano de Lucena**

Centro Universitário Maurício de Nassau - Uninassau, R. Dr. Osvaldo Lima, 130 - Derby, Recife - PE, 52010-180

**Gabriela Ayres Fragoso do Nascimento, Luiz Bezerra Carvalho Júnior**

Departamento de Bioquímica and Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da UFPE, Campus da UFPE - Av. Prof. Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária, Recife - PE, 50670-420

Corresponding author: **Mario Ribeiro de Melo-Júnior**, MsC, PhD, Departamento de Patologia da UFPE, Av. da Engenharia - Cidade Universitária, Recife - PE, 50670-420, Brasil. mariormj@gmail.com

**Conflict of Interest:** The authors report no conflicts of interest.

#### **Abstract**

**BACKGROUND** Calprotectin represents 60% of the protein content of the neutrophil cytoplasm and reflects leukocyte migration, thus allowing an evaluation of the degree and type of inflammation established.

**AIM** To evaluate the calprotectin presence in anorectal tissues of patients with inflammatory bowel diseases (Crohn's disease and ulcerative colitis) by chemiluminescence.

**METHODS** Biopsies of anorectal and intestinal tissues were obtained from 154 patients with confirmed diagnosis of Crohn's disease (n=49; active 33 = and remissive 16) and ulcerative

colitis (n=105; active 74 = and remissive 31). Their histological slides were treated with anti-calprotectin antibody conjugated to acridine ester and were immunochemiluminescently detected. As controls anorectal (n=5) and intestinal (n=11) tissues were collected from corpses with death time less than 24 h.

**RESULTS** Calprotectin was greater expressed in active stage of both CD ( $776,084 \pm 58,770$  RLU) and UC ( $306,877 \pm 26,151$  RLU) in comparison to the patients in remission (CD =  $422,880 \pm 19,369$  RLU) and (UC =  $123,450 \pm 16,001$  RLU) as well as the normal anorectal tissue ( $13,710 \pm 1,310$  URL). Furthermore, these mean values were higher for the CD compared to the UC patients.

**CONCLUSION** The Immunochemiluminescent detection enabled the quantification of calprotectin in Inflammatory Bowel Disease allowing to distinguish Crohn's disease and ulcerative colitis in their active and remissive stages.

Key Words: Inflammatory bowel disease; Calprotectin; Immunochemiluminescent; Immunohistochemistry.

## INTRODUCTION

The inflammatory bowel disease (IBD) includes Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) that are described as chronic conditions of multifactorial etiology characterized by recurrent episodes of inflammation of the gastrointestinal tract. This disease is characterized by periods of relapse when patients experience symptoms of active disease and periods of remission when the symptoms are ceased [1]. IBD may be active or inactive after effective induction of remission. Higher clinical efficacy signals, defined as significant improvement in disease activity indices: for UC, remission is defined as having a normal number of daily stools with no rectal bleeding and normal or inactive colitis on endoscopy. For CD, remission implies a corticosteroid-free with CD activity index (CDAI)  $<150$  or a Harvey–Bradshaw Index  $<4$  and endoscopic evidence of mucosal.

Although there are divergences regarding the incidence, anatomical site of involvement, clinical presentation, progression and response to therapy, the subtypes CD and UC share the same etiological aspects [2,3].

Experimental models and clinical studies suggest that this rise is due to the combined action of environmental, immunological, microbiological, and genetic factors that result in changes in the integrity of the mucosal intraluminal intestinal barrier [4].

The transepithelial flow of enteric bacteria promotes activation of innate immunity triggering the pathological process [5,6].

In the absence of a pathognomonic symptom for the CD diagnosis that enables the differentiation with the UC, and other forms of enterocolitis and irritable bowel syndrome, the differential diagnosis is based on the joint assessment of clinical data, patient history, location and extent of the lesions, contrast exams of intestinal transit and laboratory, radiological and endoscopic and histologic exams [7,8]. IBD may be active or inactive after effective induction of remission. Higher clinical efficacy signals, defined as significant improvement in disease activity indices: for UC, remission is defined as having a normal number of daily stools with no rectal bleeding and normal or inactive colitis on endoscopy. For CD, remission implies a corticosteroid-free with CD activity index (CDAI lesser than 150) or a Harvey–Bradshaw Index (lower than 4) and endoscopic evidence of mucosal.

The inflamed intestinal mucosa contains many neutrophils and proteins derived from these cells, such as the alpha-1-antitrypsin, elastase, calprotectin and lactoferrin [9]. Calprotectin is a protein-ligand of calcium and zinc from the S-100 family, which represents 60% of the neutrophils cytosol protein and performs immunoregulator and antimicrobial roles [9].

High levels of calprotectin in patients with IBD are resulting from the increase in the infiltration of neutrophils in the intestinal mucosa and transmigration to the intestinal lumen. Other neutrophil-based proteins such as elastase, myeloperoxidase and lysozyme seem to have potential as markers of gastrointestinal inflammation. However, the calprotectin presents an advantage over these proteins due to representing 60% of the protein of cytosol of neutrophils [9].

Fecal calprotectin (FCP) is widely used to monitor disease activity and as a screening test for the differential diagnosis of IBD and another irritable bowel syndrome. The concentration of FCP in active IBD patients has demonstrated values ranging from 200mg/kg to 20,000mg/Kg. These findings support the hypothesis that the increase of calprotectin is a result of the migration of neutrophils from the inflamed mucosa to the intestinal lumen [10,11].

The immunochemiluminescence assays are based on detection of the light emission due to the reaction between the antigen and antibody marked by chemiluminescent compound, as the ester of acridine. This procedure presents a higher sensitivity compared to spectrophotometric or colorimetric assays showing

detection range of femtomole or attomole ( $10^{-15}$  to  $10^{-18}$  mol) with great analytical stability [12].

In our lab, a set of contributions demonstrated that the use of biomolecules labeled with ester of acridine as probes is capable to reveal specifically and quantitatively the different antigens when compared with traditional histochemistry reactions [13-18].

In this study, the anti-calprotectin antibody was conjugated with acridinium ester for immunochemiluminescent calprotectin detection in tissues of anorectal patients with either Crohn's disease or ulcerative colitis. Immunohistochemistry detection of calprotectin was also established by using antibody-peroxidase procedure as comparison.

## MATERIALS AND METHODS

### ***Participants***

Samples of anorectal and intestinal tissue were obtained through biopsy (Professor Medina Biopsy forceps 3 mm) from 154 patients with confirmed diagnosis Crohn's disease (n=49) and ulcerative colitis (n=105), regularly treated in the outpatient clinic of Proctology Sector of Hospital Barão de Lucena and Hospital das Clínicas at the State of Pernambuco, Brazil. The mean age was 39 years for Crohn's disease (55% women) and 44 years for ulcerative colitis (75% women).

These patients were separately investigated into two subgroups: active Crohn's disease (n=33) and in remission (n=16); active ulcerative colitis (n=74) and in remission (n=31). The inclusion criteria of either Crohn's disease or ulcerative colitis established through clinical, radiological, endoscopic, and histopathological findings. It was dispensed patients with undetermined colitis or who undergoing any recent surgery due to gastrointestinal disorders. As controls anorectal (n=5) and intestinal (n=11) tissues were collected from corpses with death time less than 24 h.

This research was previously approved by the Health Science Centre Bioethical Board from *Universidade Federal de Pernambuco* (UFPE), Brazil, CEP/CCS/UFPE number 316/2010 and informed consent was obtained from all patients.

### ***Anti-calprotectin conjugation with acridinium ester***

The conjugation of acridinium ester (AE) with the antibody Calprotectin S100A8/A9 (monoclonal antibody to human MRP8/14 BMA biomedical) was

performed using the kit Acridinium Ester Labeling Worksheet (Enzo Life Sciences Catalog No. ADI-907-001). Monoclonal anti-calprotectin (100  $\mu$ L) was incubated with a solution of EA (1  $\mu$ L) for 1h at 25°C. For the separation of the conjugate (AntiCalprotectin-AE) from the other constituents (non-conjugated antibody and AE-free), the sample was subjected to chromatography of molecular exclusion, by means of a column of Sephadex G-25 (10 x 1 cm) previously incubated with phosphate buffered sodium (PBS), pH 7.2. During the elution 15 aliquots of 1 mL were collected. The amount of protein and chemiluminescence of the samples were determined, respectively, by reading at 280 nm in a spectrophotometer (model Ultrospec 2100 pro; Amersham Biosences) and using a luminometer (single pipe 9200-001 module; Turner BioSystems).

#### ***Immunochemiluminescent measurements***

For the tissue's analysis, the histological slides (0.3x0.3x8x10<sup>-4</sup> cm) were submitted to two analytical procedures (triplicates): 1) immunochemiluminescent and immunohistochemistry.

Firstly, the tissue slides were incubated with 100  $\mu$ L of the conjugated antibody-AE for two hours at 4° C and they were washed in PBS. After washing the tissue sample, it was transferred to polypropylene tube, (1.5 mL) with 100  $\mu$ L of PBS. The chemiluminescence of the conjugate present in the samples was measured by luminometer single pipe 9200-001 module (Turner BioSystems). To trigger the reaction of chemiluminescence, it is required the sequential addition of 50  $\mu$ L of a solution 0.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 0.1 N nitric acid (trigger A) to 50  $\mu$ L sample followed by rapid alkalization of the medium from the addition of 50 $\mu$ L of NaOH to 0.25 N (trigger B). The emission intensity was determined as relative light units (RLU) with a counting time of 5 seconds per sample. All the measurements were performed in triplicates.

#### ***Immunohistochemistry study***

The second tissue samples were submitted to indirect staining with the antibody anticalprotectin (S100A8/A9 Calprotectin monoclonal antibody to human MRP8/14 BMA biomedical). The recovery of the antigen was performed with citrate buffer 100 mM pH 6.0 in pressure cooker for 2 minutes after boiling. Subsequently, the samples were cooled to 35°C and then incubated with a solution of hydrogen peroxide for 30 minutes at room temperature to block endogenous peroxidase. Subsequently, the

tissues were incubated with monoclonal antibodies anti-calprotectin (1:200) during 2 hours at 37°C. The location of the antibody was performed using the detection system Reveal Polyvalent Free Biotin-DAB (Biogen). All washes performed between the steps used PBS solution 100 mM, pH 7.2 with NaCl 150 mM. For the negative control, the monoclonal anti-calprotectin was replaced by PBS.

### ***Digital histomorphometric analysis***

For quantitative analysis of immunohistochemistry, three fields were selected in each case, where images with final magnification in 400x were captured. The histomorphometric study of histological slides images was performed by means of a workstation consisting of video-camera CCBBW 410 (Samsung®) coupled to an optical microscope (Olympus BH-2) and computer containing the software MOTIC Image Plus 2.0. The histomorphometric parameter used was the distribution of the calprotectin marking (in pixels) per field captured in histological slide (total area of the field = 12,234  $\mu\text{m}^2$ ) using the GIMP software - GNU Image Manipulation Program, version 2.8.18.

### ***Statistical analysis***

The software OriginPro SR4 version 8.0 (OriginLab Corporation, One Roundhouse Plaza, Northampton, MA 01060 USA) was used for the statistical analysis of the results obtained from the immunochemiluminescence and data were expressed as mean and standard deviation. The data obtained in the histomorphometric study were submitted to ANOVA of single factor, Tukey test and Shapiro-Wilk with significance level of 5% ( $p < 0.05$ ), using the GraphPad Prism® version 9.0 (GraphPad Software Inc., USA).

## **RESULTS**

The anti-calprotectin conjugated with acridinium ester (AntiCalprotectin-AE) was collected in the 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> fractions by the Sephadex G-25 columns as there was the superposition of protein and chemiluminescent peaks. This result is in accordance with previous reports [13-15]. This conjugate was used to investigate the presence of calprotectin in inflammatory lesions related to IBD (FIGURE 1). It was noticed a greater expression of calprotectin in groups of active diseases (776,084  $\pm$  58,770 RLU for CD and 306,877  $\pm$  26,151 RLU for UC) in comparison to the remissive ones (422, 880  $\pm$  19,369 RLU for CD and 294,107  $\pm$  31,851 RLU for UC) as well as in the normal

anorectal tissues ( $57,400 \pm 9719$ ). Furthermore, the values for CD were higher than those for UC either actives or remissives.

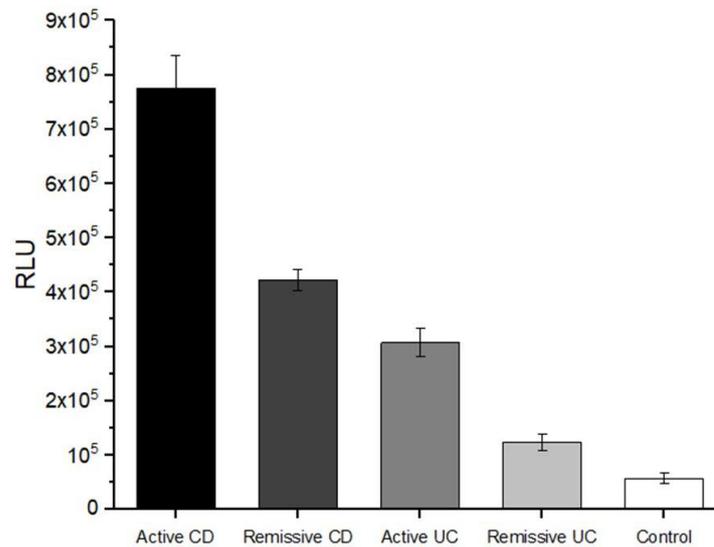


FIGURE 1. The presence of calprotectin in inflammatory lesions related to active Crohn's disease (CD), remissive CD, active ulcerative colitis (UC), remissive UC and controls.

In the immunohistochemistry study, the tissue expression was observed primarily in the cytosol of inflammatory cells such as polymorphonuclear cells (FIGURE 2).

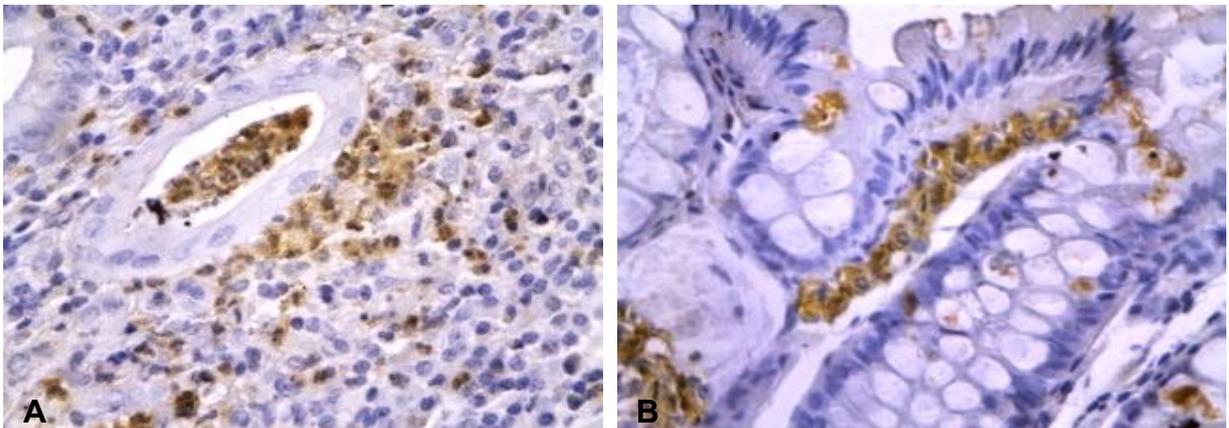


FIGURE 2. **Calprotectin immunoreactivity in an inflammatory infiltrate of IBD.** A tissue expression was observed mainly in the cytosol of inflammatory cells of the polymorphonuclear type both in CD (Figure 2-A) and in UC (Figure 2-B). 400X.

The analysis of the images allowed the quantification in pixel of the immunoreactivity, demonstrating that the marking of the calprotectin was more intense in inflamed tissues when compared to tissues clinically normal or remissives CD and

UC despite that there was no statistical significant immunoreactivity for calprotectin (TABLE 1).

**Table 1:** Morphometric data of calprotectin immune expression in tissues of patients with Crohn's disease (CD), ulcerative colitis (UC), and controls.

Active CD	Remission CD	Active UC	Remission UC	Control
Average $\pm$ SD ( $\mu$ )				
$1.08 \times 10^7 \pm 0.58 \times 10^7$	$9.55 \times 10^2 \pm 4.27 \times 10^2$	$6.99 \times 10^6 \pm 3.72 \times 10^6$	$5.98 \times 10^2 \pm 2.15 \times 10^2$	$5.1 \times 10^4 \pm 4.8 \times 10^4$

\*Total area of the capture field = 12,234  $\mu\text{m}^2$

## DISCUSSION

The prevalence of IBD in the western world is up to 0.5% of the general population and the increase in the incidence rate is more accentuated in newly industrialized countries. It is estimated an exponential increase in the number of patients with IBD who live in the western world during the next decade [19].

Populations with a high prevalence, such as regions in North America and Europe point to a higher frequency of IBD between the second and fourth decade of life, and it may affect men and women equally. In this sense, the results found in this study about the age and gender distribution corroborate with the recent epidemiological findings of IBD [19,20].

The calprotectin (S100A8/A9) is a protein present in cytoplasm neutrophils, activated during cellular stress, being considered an important Damage Associated Molecular Pattern (DAMP). Recent clinical studies have confirmed the value of diagnosis and assessment of disease activity of calprotectin in IBD [21]. It is a biomarker of in progress neutrophil-driven inflammation, because when neutrophils rupture during intestinal inflammation, calprotectin is released into the tissue, from where it is secreted into the faeces [22].

Calprotectin levels directly correlate with the severity of CD or UC, a strong positive correlation between increased calprotectin and the level of intestinal inflammation as determined by endoscopic and histologic analysis [23].

Multiple studies [24-28] have proven the use of calprotectin in IBD patients as a biomarker in monitoring disease activity and to avoid unnecessary invasive procedures such as endoscopies [23].

Actually, three main technologies are being used: enzyme immunoassay (ELISA), chemiluminescent immunoassay and turbidimetry. Studies are necessary to

establish whether the different assays show comparable CD and UC active or other diseases of the gastrointestinal tract and share the same cut-off values [29].

The study immunohistochemical findings are in accordance with the standards of marking of calprotectin described in the literature [30] and reaffirm the potential and accuracy of application of methodologies for chemiluminescent quantification of tissue antigens.

## CONCLUSION

This contribution demonstrated that anti-calprotectin conjugated to acridinium ester allowed the identification and quantification of calprotectin in intestinal biopsies of patients with Chron's Diseases and Ulcerative colitis and also to distinguish between the active and remissive clinical phases.

## ACKNOWLEDGEMENTS

To Professor Nicodemos Teles de Pontes Filho (*in memory*) for dedicating his life to teaching and medical research. This work was financially supported by CNPq (Grant number 401452/2016-6), CAPES (scholarship to APFS number 8882.380414/2019.01) and FINEP (grant number 01.13.0215.00).

## REFERENCES

- 1 Glassner KL, Abraham BP, Quigley EM. The microbiome and inflammatory bowel disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2020;145(1): 16-27 [PMID: 31910984. DOI: 10.1016/j.jaci.2019.11.003]
- 2 Roda G, Chien Ng S, Kotze PG, Argollo M, Panaccione R, Spinelli A, Kaser A, Peyrin-Biroulet L, Danese S. Crohn's disease. *Nat Rev Dis Primers* 2020;6(1): 1-19. [PMID: 32242028 DOI: 10.1038/s41572-020-0156-2]
- 3 Kobayashi T, Siegmund B, Le Berre C, Wei SC, Ferrante M, Shen B, Bernstein CN, Danese S, Peyrin-Biroulet L, Hibi T. Ulcerative colitis. *Nat Rev Dis Primers* 2020;10;6(1): 1-20. [PMID: 32913180 DOI: 10.1038/s41572-020-0205-x]
- 4 Graham DB, Xavier RJ. Pathway paradigms revealed from the genetics of inflammatory bowel disease. *Nature* 2020;578(7796): 527-539. [PMID: 32103191 DOI: 10.1038/s41586-020-2025-2]
- 5 Mortensen JH, Lindholm M, Langholm LL, Kjeldsen J, Bay-Jensen AC, Karsdal MA, Manon-Jensen T. The intestinal tissue homeostasis - the role of extracellular matrix remodeling in inflammatory bowel disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2019;13(10): 977-993. [PMID: 31587588 DOI: 10.1080/17474124.2019.1673729]

- 6 Benchimol EI, Bernstein CN, Bitton A, Carroll MW, Singh H, Otley AR, Vutcovici M, El-Matary W, Nguyen GC, Griffiths AM, Mack DR, Jacobson K, Mojaverian N, Tanyingoh D, Cui Y, Nugent ZJ, Coulombe J, Targownik LE, Jones JL, Leddin D, Murthy SK, Kaplan GG. Trends in Epidemiology of Pediatric Inflammatory Bowel Disease in Canada: Distributed Network Analysis of Multiple Population-Based Provincial Health Administrative Databases. *Am J Gastroenterol* 2017;112(7): 1120-1134. [PMID: 28417994 DOI: 10.1038/ajg.2017.97]
- 7 Petrey AC, de la Motte CA. The extracellular matrix in IBD: a dynamic mediator of inflammation. *Curr Opin Gastroenterol* 2017;33(4): 234-238. [PMID: 28562487 DOI: 10.1097/MOG.0000000000000368]
- 8 Yu YR, Rodriguez JR. Clinical presentation of Crohn's, ulcerative colitis, and indeterminate colitis: Symptoms, extraintestinal manifestations, and disease phenotypes. *Semin Pediatr Surg* 2017;26(6): 349-355. [PMID: 29126502 DOI: 10.1053/j.sempedsurg.2017.10.003]
- 9 Ayling RM, Kok K. Fecal Calprotectin. *Adv Clin Chem* 2018;87: 161-190. [PMID: 30342711 DOI: 10.1016/bs.acc.2018.07.005]
- 10 Mumolo MG, Bertani L, Ceccarelli L, Laino G, Di Fluri G, Albano E, Tapete G, Costa F. From bench to bedside: Fecal calprotectin in inflammatory bowel diseases clinical setting. *World J Gastroenterol* 2018;24(33): 3681-3694. [PMID: 30197475 DOI: 10.3748/wjg.v24.i33.3681]
- 11 Goll R, Heitmann R, Moe ØK, Carlsen K, Florholmen J. Head to head comparison of two commercial fecal calprotectin kits as predictor of Mayo endoscopic sub-score and mucosal TNF expression in ulcerative colitis. *PLoS One* 2019;14(12): e0224895. [PMID: 31790426 DOI: 10.1371/journal.pone.0224895]
- 12 Brown RC, Li Z, Rutter AJ, Mu X, Weeks OH, Smith K, Weeks I. Development and application of a novel acridinium ester for use as a chemiluminescent emitter in nucleic acid hybridisation assays using chemiluminescence quenching. *Org Biomol Chem* 2009;7(2): 386-94. [PMID: 19109686 DOI: 10.1039/b811947c]
- 13 Nascimento GAF, de Lima LRA, da Silva Andrade Pereira A, de Lima Bezerra Cavalcanti C, de Melo Junior MR, Chaves MEC, de Carvalho Junior LB. Chemiluminescent detection of glycode alterations in hepatic granulomatous lesions of experimental schistosomiasis. *Int J Clin Exp Pathol* 2017;10(8): 8599-8604 [PMID: 31966715 PMCID: PMC6965437]
- 14 Lima LR, Bezerra MF, Almeida SM, Silva LP, Beltrão EI, Carvalho Júnior LB. Glycophenotype evaluation in cutaneous tumors using lectins labeled with acridinium ester. *Dis Markers* 2013;35(3): 149-54. [PMID: 24167360 DOI: 10.1155/2013/787130.]
- 15 Brustein VP, Cavalcanti CL, de Melo-Junior MR, Correia MT, Beltrão EI, Carvalho LB Jr. Chemiluminescent detection of carbohydrates in the tumoral breast diseases. *Appl Biochem Biotechnol* 2012;166(2): 268-75. [PMID: 22068691 DOI: 10.1007/s12010-011-9422-9]
- 16 de Melo Rêgo MJ, Cordeiro MF, Cavalcanti Cde L, de Carvalho Junior LB, Beltrão EI. Immunohistochemiluminescence detection: a quantitative tool in breast cancer HER-2 status evaluation. *Dis Markers* 2013;34(5): 373-7. [PMID: 23478274 DOI: 10.3233/DMA-130981]
- 17 Araújo-Filho JL, Melo-Junior MR, Beltrão EI, de Lima LR, Antunes CB, de Carvalho LB Jr. Immunochemiluminescent detection of galectin-3 in tumoral tissue from prostate. *Int J Clin Exp Pathol* 2013;6(9): 1861-7. [PMID: 24040451 PMCID: PMC3759493]

18 da Silva LP, de Almeida SM, de Lima LR, Cavalcanti C de L, de Melo Lira MM, da Silva M da P, Beltrão EI, de Carvalho Júnior LB. Evaluation of glyco phenotype in prostatic neoplasm by chemiluminescent assay. *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7(7): 3800-8. [PMID: 25120756 PMID: PMC4128991]

19 Kaplan GG, Windsor JW. The four epidemiological stages in the global evolution of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2021;18(1): 56-66. [PMID: 33033392 DOI: 10.1038/s41575-020-00360-x]

20 Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Wu JCY, Chan FKL, Sung JY, Kaplan GG. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet* 2017;390(10114): 2769-2778. [PMID: 29050646 DOI: 10.1016/S0140-6736(17)32448-0]

21 Norouzinia M, Chaleshi V, Alizadeh AHM, Zali MR. Biomarkers in inflammatory bowel diseases: insight into diagnosis, prognosis and treatment. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2017;10(3): 155-167. [PMID: 29118930 PMID: PMC5660264]

22 Wang C, Baer HM, Gaya DR, Nibbs RJB, Milling S. Can molecular stratification improve the treatment of inflammatory bowel disease? *Pharmacol Res* 2019;148: 104442. [PMID: 31491469 DOI: 10.1016/j.phrs.2019.104442]

23 Vicente-Steijn R, Jansen JM, Bisheshar R, Haagen IA. Analytical and clinical performance of the fully-automated LIAISONXL calprotectin immunoassay from DiaSorin in IBD patients. *Pract Lab Med* 2020;24: e00175. [PMID: 32637525 DOI: 10.1016/j.plabm.2020.e00175]

24 Bressler B, Panaccione R, Fedorak RN, Seidman EG. Clinicians' guide to the use of fecal calprotectin to identify and monitor disease activity in inflammatory bowel disease. *Can J Gastroenterol Hepatol* 2015;29(7): 369-72. [PMID: 26125109 DOI: 10.1155/2015/852723]

25 Mosli MH, Zou G, Garg SK, Feagan SG, MacDonald JK, Chande N, Sandborn WJ, Feagan BG. C-Reactive Protein, Fecal Calprotectin, and Stool Lactoferrin for Detection of Endoscopic Activity in Symptomatic Inflammatory Bowel Disease Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Gastroenterol* 2015;110(6): 802-19. [PMID: 25964225 DOI: 10.1038/ajg.2015.120]

26 Vaghari-Tabari M, Moein S, Qujeq D, Kashifard M, Hajian-Tilaki K. Positive Correlation of Fecal Calprotectin With Serum Antioxidant Enzymes in Patients With Inflammatory Bowel Disease: Accidental Numerical Correlation or a New Finding? *Am J Med Sci* 2018;355(5): 449-455. [PMID: 29753375 DOI: 10.1016/j.amjms.2017.12.009]

27 Bello C, Roseth A, Guardiola J, Reenaers C, Ruiz-Cerulla A, Van Kemseke C, Arajol C, Reinhard C, Seidel L, Louis E. Usability of a home-based test for the measurement of fecal calprotectin in asymptomatic IBD patients. *Dig Liver Dis* 2017;49(9): 991-6. [PMID: 28587751 DOI: 10.1016/j.dld.2017.05.009]

28 Majster M, Almer S, Boström EA. Salivary calprotectin is elevated in patients with active inflammatory bowel disease. *Arch Oral Biol* 2019;107: 104528. [PMID: 31442931 DOI: 10.1016/j.archoralbio.2019104528]

29 Basso D, Zambon CF, Plebani M. Inflammatory bowel diseases: from pathogenesis to laboratory testing. *Clin Chem Lab Med* 2014;52(4): 471-81. [PMID: 24108210 DOI: 10.1515/cclm-2013-0588]

30. Fabian O, Hradsky O, Lerchova T, Mikus F, Zamecnik J, Bronsky J. Limited clinical significance of tissue calprotectin levels in bowel mucosa for the prediction of complicated course of the disease in children with ulcerative colitis. *Pathol Res Pract* 2019;215(12): 152689. [PMID: 31679791 DOI: 10.1016/j.prp.2019.152689]

## 6.2 Artigo 2

### **Análise Histoquimiluminescente das ADAMs 10 e 15 nas Doenças Inflamatórias Intestinais**

*Histochemiluminescent Analysis of ADAMs 10 and 15 in Inflammatory Bowel Diseases*

#### **RESUMO**

Sugere-se que as DII decorram de anormalidades imunológicas da mucosa gastrointestinal a partir de uma patogênese multifatorial, que envolve fatores genéticos e ambientais. Cerca de 37 proteínas ADAM são conhecidas desempenham funções regulatórias na superfície celular e no processo inflamatório. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão da ADAM10 e ADAM15, através de método histoquimiluminescente, em amostras de pacientes portadores de DC e RCU tanto na forma ativa da doença quanto em remissão clínica. Foi constatado maior expressão de ADAM 10 e 15 nos grupos com doença ativa em comparação aos pacientes em remissão. Os valores de URL para DC ativa e em remissão para ADAM10 e ADAM15 em DC foram estatisticamente significativos quando comparados entre si e com o grupo controle ( $p < 0,05$ ). Os achados deste estudo juntamente com outros achados na literatura científica sugerem que os controles da ADAM10 e ADAM15 são cruciais na sinalização das vias que regulam a homeostase intestinal e renovação tecidual.

Palavras-chave: Doença inflamatória intestinal; ADAM10; ADAM15; Imunoquimiluminescência.

#### **ABSTRACT**

It is known that IBD result from immunological abnormalities of the gastrointestinal mucosa from a multifactorial pathogenesis, which involves genetic and environmental factors. About 37 ADAM proteins are known to play regulatory functions on the cell surface and in the inflammatory process. The aim of this study was to evaluate the expression of ADAM10 and ADAM15, through a histochemiluminescent method, in samples from patients with CD and UC, both in the active form of the disease and in clinical remission. Higher expression of ADAM 10 and 15 was found in groups with active disease compared to patients in remission. The URL values for active and in remission CD for ADAM10 and ADAM15 in CD were statistically significant when compared with each other and with the control group ( $p < 0.05$ ). The findings of this study together with other findings in the scientific literature suggest that ADAM10 and ADAM15 controls are crucial in signaling pathways that regulate intestinal homeostasis and tissue renewal.

Key Words: Inflammatory bowel disease; ADAM10; ADAM15; Immunochemiluminescent.

## Introdução

A Doença de Crohn (DC) e retocolite ulcerativa (RCU) são doenças inflamatórias intestinais (DII) caracterizadas pela inflamação crônica do trato gastrointestinal com períodos de recidiva e remissão [1].

O desenvolvimento dessas doenças é resultante da soma de fatores genéticos, imunológicos e ambientais. Fatores extrínsecos como hábitos nutricionais, poluição, radiação, estresse, exposição a antibióticos e higiene modulam a funcionalidade da microbiota intestinal, influenciando na suscetibilidade do indivíduo de desenvolver DC ou RCU [2,3].

Uma característica comum da DC e RCU é a remodelação da matriz extracelular (MEC) associada a respostas inflamatórias contínuas e cicatrização das lesões intestinais. A remodelação da MEC depende de um processo dinâmico e de substâncias reguladoras da síntese e degradação do colágeno, tais como endopeptidases dependentes de zinco, metaloproteinases de matriz (MMPs) e seus inibidores (inibidores teciduais de metaloproteinases - TIMPs) [4].

ADAMs são proteínas de múltiplos domínios ancorados à membrana contendo os domínios de desintegrina e metaloproteinase A. Esta subfamília das metaloproteinases dependentes de zinco desempenha diversas funções em uma variedade de células, cuja expressão está associada a processos inflamatórios [5].

Cerca de 37 proteínas ADAM são conhecidas e essas proteínas são expressas em uma ampla variedade de células e são conhecidas como as principais proteínas regulatórias da superfície celular. O mecanismo de regulação envolve a liberação de ligantes e receptores envolvidos no contato célula-célula e sinalizando que eles podem influenciar nas interações de célula para célula. Eles também são envolvidos na clivagem e remodelação de proteínas MEC e moléculas de adesão [6,7].

As proteases ADAM estão envolvidas no processamento de ampla diversidade de substratos, incluindo fatores de crescimento, citocinas, moléculas de adesão celular e receptores [8].

A ADAM10 está associada na ativação de formas precursoras de proteínas por liberação de ectodomínio, por exemplo, fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e na degradação de mielina. Enquanto a ADAM15, distribuída por macrófagos e células endoteliais tem como função agregação plaquetária e recrutamento de citocinas pró-

inflamatórias. Tanto a ADAM10 quanto a ADAM15 têm como substrato de MEC o colágeno tipo IV [8].

Os estudos que associam a atividade das ADAMs na doença inflamatória intestinal ainda são escassos. A ADAM10 e ADAM17 (TACE - enzima conversora de TNF- $\alpha$ ) tem sido relacionada a patogênese da DII. Esses dados atuais sugerem que a inibição de ADAMs pode fornecer uma abordagem terapêutica potencial para DC e RCU, por meio redução da liberação de mediadores químicos inflamatórios, tais como o TNF- $\alpha$  [9].

O presente estudo tem como objetivo avaliar a expressão das proteases ADAM10 e ADAM15, através de método histoquimiluminescente, em amostras de pacientes portadores de DC e RCU tanto na forma ativa da doença quanto em remissão clínica.

## **Materiais e Métodos**

### *Seleção de Casos*

Amostras de tecido anorretal e intestinal foram obtidas por meio de biópsia (fórceps Professora Medina Biópsia 3 mm) de 154 pacientes com diagnóstico confirmado de doença de Crohn (n = 49) e colite ulcerosa (n = 105), regularmente tratados no ambulatório do Setor de Proctologia de Hospital Barão de Lucena e Hospital das Clínicas do Estado de Pernambuco, Brasil.

Os critérios de inclusão de doença de Crohn ou colite ulcerosa estabelecidos por meio de achados clínicos, radiológicos, endoscópicos e histopatológicos. Foram dispensados pacientes com colite indeterminada ou que realizassem alguma cirurgia recente devido a distúrbios gastrointestinais.

Após a análise dos prontuários, bem como avaliação histopatológica das amostras, os pacientes foram categorizados nos seguintes subgrupos: doença de Crohn ativa (n = 33) e em remissão (n = 16); colite ulcerativa ativa (n = 74) e em remissão (n = 31). Como controles, tecidos anorretais (n = 5) e intestinais (n = 11) foram coletados de cadáveres com tempo de morte inferior a 24 h.

### *Conjugação do Éster de Acridina ao Anticorpo Anti-ADAM10 e Anti-ADAM15*

A conjugação do éster de acridina (EA) com os anticorpos ADAM 10 (*polyclonal antibody to human ab227172 ABCAM*) e ADAM15 (*polyclonal antibody to human*

[EPR5619] ab124698 ABCAM) foi realizada utilizando o kit *Acridinium Ester Labeling Worksheet* (Enzo Life Sciences Catalog nº. ADI-907-001). Para conjugação foram incubados 100 µL do anticorpo anti-calprotectina com 1 µL da solução de EA por 1h a 25° C.

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

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

#### *Detecção Histoquimiluminescente*

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

A quimiluminescência do conjugado presente nas amostras foi mensurada pelo luminômetro tubo único módulo 9200-001 (Turner BioSystems). Para desencadear a reação de quimiluminescência é necessária a adição sequencial de 50 µL de uma solução 0,5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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).

## **Resultados**

Os conjugados AntiADAM10-EA e AntiADAM15-EA foram utilizados para evidenciar a presença das ADAMs em tecidos de pacientes com DII e os resultados são apresentados na Figura 1. Foi constatado maior expressão de ADAM 10 e 15 nos grupos com doença ativa em comparação aos pacientes em remissão.

Os valores de URL para DC ativa e em remissão para ADAM10 e ADAM15 em DC foram estatisticamente significativos quando comparados entre si e com o grupo controle ( $p < 0,05$ ). Contudo, para RCU tanto os valores de ADAM10 quanto ADAM15

não foram estatisticamente significativos para diferenciação entre pacientes com doença ativa e remissão, apenas com o grupo controle.

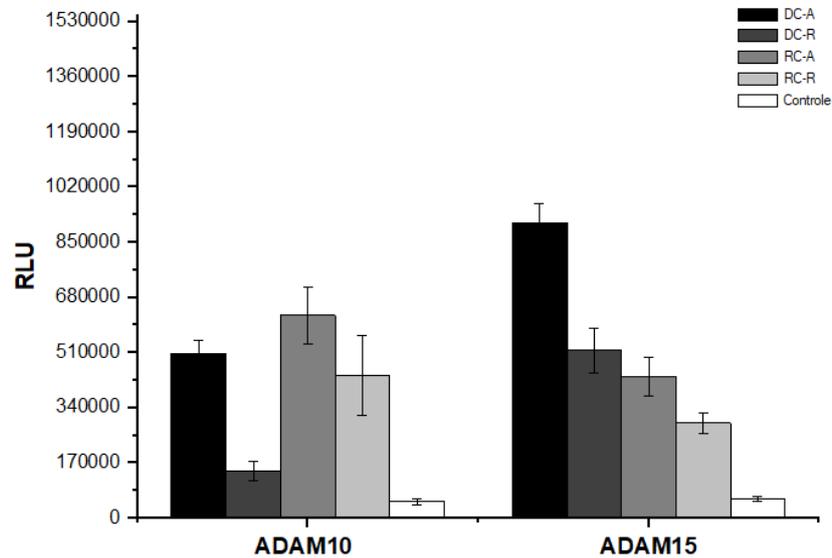


Figura 1. Comparação entre o perfil histoquimiluminescente da ADAM10 e ADAM15 nos grupos do estudo.

Os valores médios de ULR para ADAM10 (Tabela 1) foram  $776084 \pm 58770$  ULR para DC ativa,  $42288 \pm 19369$  ULR para DC em remissão,  $306877 \pm 26151$  ULR para RCU ativa e de  $123450 \pm 16001$  ULR para RCU em remissão, enquanto um valor de  $5740 \pm 2710$  ULR foi encontrado no controle.

Tabela 1: Valores de URL da ADAM10 nas amostras teciduais de DII e controle.

	<b>DC- A</b>	<b>DC-R</b>	<b>RCU-A</b>	<b>RCU-R</b>	<b>Controle</b>
Mínimo	431522	109163	479374	250257	3633
Máximo	572347	209192	770965	623406	9515
Média	507824	144103	626132	438645	5946
<i>dp</i>	$\pm 41896$	$\pm 30003$	$\pm 87678$	$\pm 122715$	$\pm 1745$

URL: unidade relativa de luz; *dp*: desvio padrão.

Já para a ADAM15 (Tabela 2)  $776084 \pm 58770$  ULR para DC ativa,  $42288 \pm 19369$  ULR para DC em remissão,  $306877 \pm 26151$  ULR para RCU ativa e de  $123450 \pm 16001$  ULR para RCU em remissão, enquanto um valor de  $5740 \pm 2710$  ULR foi encontrado no controle. A média entre os valores de ULR dos grupos de DII ativa (DC-A e RCU-A) e em remissão (DC-R e RCU-R) foi significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao grupo controle.

Tabela 2: Valores de URL da ADAM15 nas amostras teciduais de DII e controle.

	<b>DC- A</b>	<b>DC-R</b>	<b>RCU-A</b>	<b>RCU-R</b>	<b>Controle</b>
Mínimo	816289	426462	333625	255381	10667
Máximo	1012544	607009	532855	350287	15489
Média	910833	517555	438020	294107	13710
<i>dp</i>	±58862	±69096	±59443	±31851	±1310

URL: unidade relativa de luz; *dp*: desvio padrão.

## Discussões

Em nosso laboratório, nos últimos anos, diversos artigos têm demonstrado que o uso de biomoléculas marcadas com éster de acridina como sondas é capaz de revelar de forma específica e quantitativa os diferentes antígenos quando comparados às reações imunoistoquímicas tradicionais [10-15].

A expressão tecidual de ADAM10 e ADAM15 foi mais evidente nos pacientes com DC e RCU clinicamente ativas. Estudos apontam que o estresse oxidativo é um potente estimulador de ADAM10 [16-18], sendo assim o estresse oxidativo durante o processo inflamatório intestinal seria um importante regulador das atividades proteolíticas mediadas por ADAM10 [19].

No estudo preliminar de Dempsey (2017) foi observado redução no processo de regeneração das criptas intestinais nos tecidos deficiente em ADAM10 após lesão induzida por radiação ou doxorrubicina. Essas descobertas sugerem que a sinalização mediada por ADAM10 provavelmente contribui para a regeneração das criptas após as lesões ativas [6]. Fato esse, que corrobora com os valores mais baixos encontrados para os pacientes com doença em remissão, ou seja, que não apresentavam lesões teciduais ativas e, portanto, não apresentavam evidências histológicas de reparo tecidual.

Por serem condições clínicas crônicas e recidivantes, a DC e a RCU apresentam altos níveis de citocinas inflamatórias, respostas imunes que danificam os tecidos, a integridade da mucosa e da barreira transepitelial, levando ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e estresse oxidativo [20]. Conseqüentemente, os achados deste estudo, evidenciando valores significativamente mais altos de ADAMs em pacientes com doença ativa, sugerem que tanto a ADAM10 quanto a ADAM15 participam ativamente do processo inflamatório tanto na DC quanto na RCU.

Além do processo inflamatório exacerbado, os pacientes com RCU podem apresentar diminuição na diferenciação de células calciformes secretoras, que está diretamente associada com aumento da via de sinalização dependente da ADAM10 – a via Notch. Esta via de sinalização é essencial para polarização de macrófagos inflamatórios (M1) e regenerativos (M2) e para diferenciação funcional de populações de células dendríticas no intestino via relacionada [21,22].

Estudos sugerem [23-26], uma expressão diferencial de ADAM15 em células epiteliais durante a DII em comparação com o cólon normal. Este estudo sugere um papel para ADAM15 na diferenciação da mucosa colônica regenerativa e na transmigração de leucócitos através das barreiras epiteliais e endoteliais.

O estudo publicado em 2006 por Mosnier e colaboradores que descreveram a função adesiva, a distribuição tecidual e os ligantes da ADAM15 na doença inflamatória intestinal. Nesse estudo, no cólon normal, a ADAM15 foi expressa na membrana basolateral de todas as células epiteliais da cripta, bem como pelas células endoteliais. Já na DII, ADAM15 foi expressa tanto na membrana plasmática quanto no citoplasma das células epiteliais em crises agudas da doença [27].

Outro dado digno de nota, deve-se ao fato de que a expressão tecidual da ADAM15 em pacientes com DC ativa foi superior quando comparado aos valores de pacientes com RCU ativa. Isso pode ser compreendido a partir da fisiopatologia da DC, que apresenta lesões infiltrativas na mucosa enquanto na RCU observamos lesões mais superficiais [28].

O estudo *in vitro* de Babendreyer e colaboradores publicado em 2019, usando linhagens de células intestinais mostraram que os neutrófilos a migração através das monocamadas epiteliais ocorre por meio de uma rota paracelular. Os autores levantam a hipótese de que ADAM15 participa na migração de leucócitos através do epitélio, devido uma forte expressão de ADAM15 por células epiteliais revestindo as criptas durante a inflamação ativa e no equilíbrio entre a regeneração epitelial e a diferenciação durante a inflamação doença intestinal [28].

## **Conclusões**

A ADAM10 desempenha um papel central na homeostase das criptas intestinais. do desenvolvimento e trato gastrointestinal adulto. A sinalização Notch é a via regulada por ADAM10 dentro da célula-tronco da cripta e a inibição dessa

protease está associada com proliferação celular e atividade de células-tronco reduzidas para células de linhagem secretora.

Os achados deste estudo juntamente com outros achados na literatura científica sugerem que os controles da ADAM10 e ADAM15 são cruciais na sinalização das vias que regulam a homeostase intestinal e renovação tecidual. Estudos adicionais são necessários para definir o papel das proteases da família ADAM em células intestinais de pacientes acometidos por doença inflamatória intestinal.

## Referências

- [1] ANBAZHAGAN, Arivarasu N. et al. Pathophysiology of IBD associated diarrhea. **Tissue barriers**, v. 6, n. 2, p. e1463897, 2018.
- [2] ALEXDÓTTIR, Marta S. et al. Biomarkers reflecting extracellular matrix turnover and inflammation can be used to monitor disease activity and treatment response in patients with Crohn's disease undergoing infliximab induction therapy. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 15, n. Suppl (1), p. S453-S454, 2021.
- [3] PETAGNA, L. et al. Pathophysiology of Crohn's disease inflammation and recurrence. **Biology direct**, v. 15, n. 1, p. 1-10, 2020.
- [4] DERKACZ, Alicja et al. The Role of Extracellular Matrix Components in Inflammatory Bowel Diseases. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 5, p. 1122, 2021.
- [5] SMITH JR, Timothy M.; THARAKAN, Anuj; MARTIN, Rebecca K. Targeting ADAM10 in cancer and autoimmunity. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 499, 2020.
- [6] DEMPSEY, Peter J. Role of ADAM10 in intestinal crypt homeostasis and tumorigenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1864, n. 11, p. 2228-2239, 2017.
- [7] SAMMEL, Martin et al. Differences in Shedding of the Interleukin-11 Receptor by the Proteases ADAM9, ADAM10, ADAM17, Meprin  $\alpha$ , Meprin  $\beta$  and MT1-MMP. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 15, p. 3677, 2019.
- [8] WIERCINSKA-DRAPALO, Alicja et al. MMPs and ADAMs in Inflammatory Bowel Disease. Proteases in Gastrointestinal Tissues. **Springer**, Dordrecht, 2006. p. 235-254.
- [9] ZUNKE, Friederike; ROSE-JOHN, Stefan. The shedding protease ADAM17: physiology and pathophysiology. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1864, n. 11, p. 2059-2070, 2017.
- [10] NASCIMENTO, Gabriela Ayres Fragoso et al. Chemiluminescent detection of glycode alterations in hepatic granulomatous lesions of experimental schistosomiasis. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 10, n. 8, p. 8599, 2017.
- [11] LIMA, Luiza Rayanna Amorim et al. Glycophenotype evaluation in cutaneous tumors using lectins labeled with acridinium ester. **Disease markers**, v. 35, n. 3, p. 149-154, 2013.

- [12] BRUSTEIN, Vanessa Passos et al. Chemiluminescent detection of carbohydrates in the tumoral breast diseases. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 166, n. 2, p. 268-275, 2012.
- [13] DE MELO RÉGO, Moacyr Jesus Barreto et al. Immunohistochemiluminescence detection: A quantitative tool in breast cancer HER-2 status evaluation. **Disease markers**, v. 34, n. 5, p. 373-377, 2013.
- [14] ARAÚJO-FILHO, Jorge Luiz et al. Immunochemiluminescent detection of galectin-3 in tumoral tissue from prostate. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 6, n. 9, p. 1861, 2013.
- [15] DA SILVA, Lúcia Patrícia Bezerra Gomes et al. Evaluation of glyco phenotype in prostatic neoplasm by chemiluminescent assay. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 7, n. 7, p. 3800, 2014.
- [16] TSAI, Yu-Hwai et al. ADAM10 regulates Notch function in intestinal stem cells of mice. **Gastroenterology**, v. 147, n. 4, p. 822-834. e13, 2014.
- [17] BASS, Rosemary; EDWARDS, Dylan R. ADAMs and protein disulfide isomerase: the key to regulated cell-surface protein ectodomain shedding?. **Biochemical Journal**, v. 428, n. 3, p. e3-e5, 2010.
- [18] SANDERSON, Michael P. et al. ADAM10 mediates ectodomain shedding of the betacellulin precursor activated by p-aminophenylmercuric acetate and extracellular calcium influx. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 3, p. 1826-1837, 2005.
- [19] SMITH JR, Timothy M.; THARAKAN, Anuj; MARTIN, Rebecca K. Targeting ADAM10 in cancer and autoimmunity. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 499, 2020.
- [20] PIECHOTA-POLANCZYK, Aleksandra; FICHNA, Jakub. The role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 387, n. 7, p. 605-620, 2014.
- [21] ZHENG, Xiu et al. Suppression of hath1 gene expression directly regulated by hes1 via notch signaling is associated with goblet cell depletion in ulcerative colitis. **Inflammatory bowel diseases**, v. 17, n. 11, p. 2251-2260, 2011.
- [22] GERSEMANN, Michael; STANGE, Eduard Friedrich; WEHKAMP, Jan. From intestinal stem cells to inflammatory bowel diseases. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 17, n. 27, p. 3198, 2011.
- [23] BÖHM, Beate B. et al. ADAM15 adds to apoptosis resistance of synovial fibroblasts by modulating focal adhesion kinase signaling. **Arthritis & Rheumatism**, v. 65, n. 11, p. 2826-2834, 2013.
- [24] CHATTERJEE, Victor et al. MicroRNA-147b regulates vascular endothelial barrier function by targeting ADAM15 expression. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. e110286, 2014.
- [25] AGLIATA, Iolanda et al. The DNA methylome of inflammatory bowel disease (IBD) reflects intrinsic and extrinsic factors in intestinal mucosal cells. **Epigenetics**, v. 15, n. 10, p. 1068-1082, 2020.
- [26] ONFROY-ROY, Lauriane et al. Extracellular matrix mechanical properties and regulation of the intestinal stem cells: when mechanics control fate. **Cells**, v. 9, n. 12, p. 2629, 2020.

[27] BABENDREYER, Aaron et al. The metalloproteinase ADAM15 is upregulated by shear stress and promotes survival of endothelial cells. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 134, p. 51-61, 2019.

[28] MOSNIER, Jean-Francois et al. ADAM15 up-regulation in inflammatory bowel disease and cooperation with multiple partners. **Laboratory Investigation** v. 86, p. 1064–1073, 2006.

### 6.3 Artigo 3

## **Análise Histopatológica e Imunoistoquímica da $\beta$ -catenina e a e-caderina nas Doenças Inflamatórias Intestinais**

*Histopathological and Immunohistochemical Analysis of  $\beta$ -catenin and e-cadherin in Inflammatory Bowel Diseases*

### **RESUMO**

O aumento da remodelação da MEC constitui uma importante característica das DII. A resposta inflamatória excessiva e prolongada que ocorre no tecido intestinal é causa de alterações progressivas na arquitetura tecidual dos portadores de DC e RCU. O presente estudo a avaliação histopatológica e morfométrica da matriz extracelular nas doenças inflamatórias intestinais, bem como, estabelecer o perfil de imunoexpressão da  $\beta$ -catenina e e-caderina em amostras teciduais de pacientes com doença de Crohn e retocolite ulcerativa.

Palavras-chave: Doença inflamatória intestinal; Histopatologia; Colágeno; Imunoistoquímica;  $\beta$ -catenina; e-caderina.

### **ABSTRACT**

Increased ECM remodeling is an important feature of IBD. The excessive and prolonged inflammatory response that occurs in the intestinal tissue causes progressive changes in tissue architecture in patients with CD and UC. The present study aimed at the histopathological and morphometric evaluation of the extracellular matrix in inflammatory bowel diseases, as well as establishing the profile of  $\beta$ -catenin and e-cadherin immunoexpression in tissue from patients with Crohn's disease and ulcerative colitis.

Key Words: Inflammatory bowel disease; Histopathology; Collagen; Immunohistochemistry;  $\beta$ -catenin; e-cadherin.

### **Introdução**

As Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) compreendem um grupo de enfermidades crônicas e autoimunes, das quais se destacam a Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RCU), que são caracterizadas por períodos de recidiva e de remissão [1].

Na DC, a inflamação pode ocorrer em qualquer parte do trato gastrointestinal. Contudo, geralmente as lesões estão localizadas na última região do íleo e do cólon, intercaladas por regiões de tecido intestinal saudável. A inflamação na DC pode afetar

a parede intestinal em toda a sua profundidade, da mucosa à serosa [2]. Na RCU, por outro lado, a inflamação é observada no reto de maneira difusa e contínua, geralmente restringe-se à mucosa e submucosa intestinal [3].

O aumento da remodelação da matriz extracelular (MEC) é uma das características definidoras das DII. A resposta inflamatória excessiva e prolongada que ocorre no tecido intestinal é causa de alterações progressivas na estrutura e nos componentes da MEC intestinal [4].

Dentre as proteínas da matriz extracelular, destacam-se colágenos, fibronectina, laminina, vitronectina ou tenascina. A degradação da MEC em pacientes com DII é decorrente ao aumento da atividade das metaloproteinases (MMP). Além das MMPs, o processo de remodelação da MEC nas DII também envolve elastases de neutrófilos e meprinas. A perturbação do equilíbrio entre os mediadores regulatórios da remodelação da MEC juntamente com o processo inflamatório exacerbado típico da doença pode levar à fibrose intestinal, uma complicação comum em pacientes com DII de longo prazo [5].

A  $\beta$ -catenina e a e-caderina são glicoproteínas que desempenham papel fundamental na transição epitelial-mesenquimal e na adesão célula-a-célula. A falha no complexo  $\beta$ -catenina + e-caderina está relacionada a perda da integridade da barreira mucosa intraluminal intestinal [6,7].

A hiperativação da via de sinalização da  $\beta$ -catenina é considerada um marco da tumorigênese colorretal e tem sido recentemente implicada na evasão imunológica, invasão tecidual e metástase [7].

A e-caderina é o principal componente adesivo da junção aderente e regula a permeabilidade paracelular, facilitando a formação de junções estreitas e organizando todo o complexo de junção epitelial. Com a progressão das DII a função de barreira diminui, comprometendo a saúde da mucosa. Estudos em modelo experimental animal, sugerem que a e-caderina pode ser promissora na terapêutica da retocolite, diminuindo a hiperplasia da mucosa, o infiltrado inflamatório e a de perda de células glandulares [8].

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivos principais a avaliação histopatológica e morfométrica da matriz extracelular nas doenças inflamatórias intestinais, bem como, estabelecer o perfil de imunoexpressão da  $\beta$ -catenina e e-caderina em amostras teciduais de pacientes com doença de Crohn e retocolite ulcerativa.

## **Materiais e Métodos**

### *População de Estudo e Aspectos Éticos*

Foram coletadas 154 amostras teciduais de pacientes adultos com diagnóstico confirmado de doença de Crohn (n = 49) e retocolite ulcerativa (n = 105), regularmente atendidos no Serviço de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE). Como controles foram utilizadas amostras de tecido intestinal (n = 16) de cadáveres do Serviço de Verificação de Óbitos (SVO) também localizado na UFPE.

A fim de se estabelecer correlações entre os possíveis agentes causais ou contributivos para as lesões em estudo, os fatores como sexo, faixa etária, localização das lesões, histórico de câncer, hábitos nutricionais, estilo de vida, medicamentos utilizados e outras doenças associadas foram obtidos através da análise dos prontuários dos pacientes e aplicação de questionário.

A pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética em pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE), CAAE: 63952217.6.0000.5208, sob Ofício nº 1.955.690/2017 CEP/CCS e Registro de Pesquisa CEP/CCS/UFPE nº 222/10.

### *Análise Histopatológica*

As amostras teciduais, obtidas através de biópsia (pinça Prof. Medina para biópsia 3 mm), foram embebidas em formalina a 10% tamponada e posteriormente emblocadas em parafina.

No processamento histológico, após a microtomia dos blocos de parafina, os cortes histológicos obtidos (5 µm) foram desparafinizados, hidratados e submetidos as técnicas de coloração hematoxilina e eosina (HE), tricrômico de Masson (TM), *Picrosirius red*, ácido periódico de Shiff (PAS) e azul de alcian (AB).

### *Análise Histomorfométrica do Colágeno*

O processo usado para análise das lâminas histológicas consistiu-se em um sistema de vídeo-câmera acoplado a um microscópio óptico (Olympus BH-2). O sistema interativo de análise de imagens utiliza o *software* OPTIMAS® e Câmera digital

CCBBW 410 (Samsung®), disponíveis no Laboratório de Morfometria e Análise de Imagens do Programa de Pós-Graduação em Saúde Translacional da UFPE.

Os parâmetros morfométricos adotados foram a área média total ( $\mu\text{m}^2$ ), distribuição da área média (em pixels) de colágeno intersticial por campo captado na lâmina histológica (área total do campo =  $12.234 \mu\text{m}^2$ ). A análise quantitativa das fibras foi aferida utilizando sistema automático, estudando-se três campos em cada caso. Os *softwares* utilizados para as análises histomorfométricas foram o GIMP (GNU Image Manipulation Program) versão 2.10 (2019) e o ImageJ versão 1.52 (2019).

#### *Imunoistoquímica da $\beta$ -catenina e a e-caderina*

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

A localização do anticorpo foi realizada utilizando-se o sistema de detecção *Reveal Biotin-Free Polyvalent DAB* (Biogen SPD-060, Brasil), sua revelação com DAB- $\text{H}_2\text{O}_2$  e contra-corados com hematoxilina. Todas as lavagens realizadas entre as etapas descritas utilizaram tampão fosfato de sódio 100Mm, pH 7,2 com NaCl 150 mM (PBS). Para o controle negativo, os anticorpos foram substituídos por PBS.

## **Resultados e Discussões**

### *Análise Epidemiológica*

Inicialmente, a população de estudo compreendeu três grupos: doença de Crohn (n = 49), retocolite ulcerativa (n = 105) e controle (n = 16). A média de idade dos 154 pacientes foi de 39 anos (19 – 70 anos), sendo 63 indivíduos do sexo masculino e 91 feminino, a frequência foi maior em mulheres em ambos os grupos (55% para DC e 75% para RCU).

Os pacientes do estudo não relataram cânceres anteriores, contudo o histórico familiar em parentes de primeiro grau foi relatado em 19 pacientes com DC e em 34 no grupo com RCU.

Quanto aos hábitos, o consumo de álcool foi observado em 44% dos pacientes com DC, enquanto na RCU observamos em 29% dos casos. 45% dos pacientes com DC e 33% com RCU são fumantes ou fumaram por um período superior a 2 anos em algum momento da vida.

Em relação aos medicamentos, 27 pacientes estavam sob o uso de azatioprina, 9 pacientes utilizavam a combinação azatioprina e mesalazina, 59 sob monoterapia com a mesalazina e 7 com sulfassalazina. Quanto ao uso dos fármacos biológicos (inibidores do TNF), apenas 7 pacientes estavam sob tratamento com infliximabe e 5 com adalimumabe. Além do tratamento convencional, 46 pacientes estavam realizando imunossupressão com corticosteroides.

### *Análise Histopatológica*

Após levantamento dos dados clínicos dos prontuários, as amostras foram coradas com Hematoxilina-eosina, analisadas histologicamente e os grupos foram divididos em DC Ativa (n = 33), DC Remissão (n = 16), RCU Ativa (n = 74) e RCU Remissão (n= 31).

Anormalidades criptográficas difusas, inflamação crônica, atrofia, presença de irregularidades nas vilosidades, depleção de muco e criptite configuram as principais características histológicas observadas na RCU. Na Figura 1, nota-se distorção difusa e atrofia de criptas em amostra de biópsia colorretal típica de RCU.

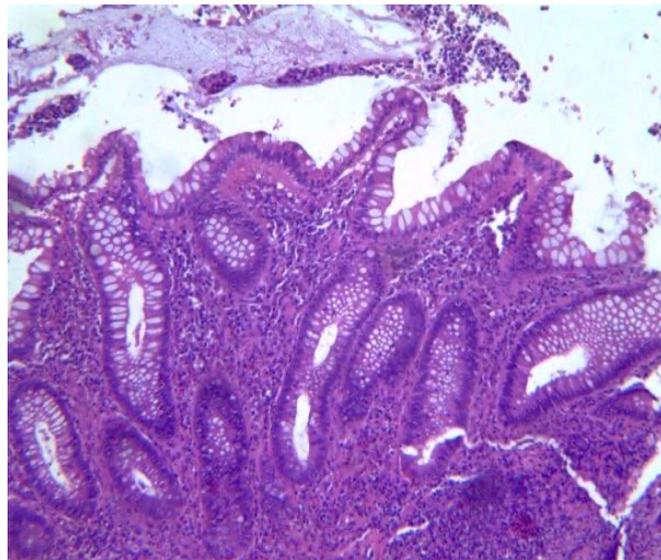


Figura 1: **Atrofia das criptas na retocolite ulcerativa.** Hematoxilina-eosina (Magnificação 100x).

Microscopicamente, a inflamação na RCU está confinada à mucosa. A mucosa é degradada por um processo inflamatório com ulceração que prejudica a mucosa

circundante (Figura 2-A). No exame microscópico em maior aumento, observa-se inflamação da mucosa extensa. O epitélio da mucosa do cólon demonstra perda de células caliciformes. A forma das criptas está distorcida. Um exsudato está presente na superfície. Tanto as células inflamatórias agudas quanto as crônicas estão presentes (Figura 2-B).

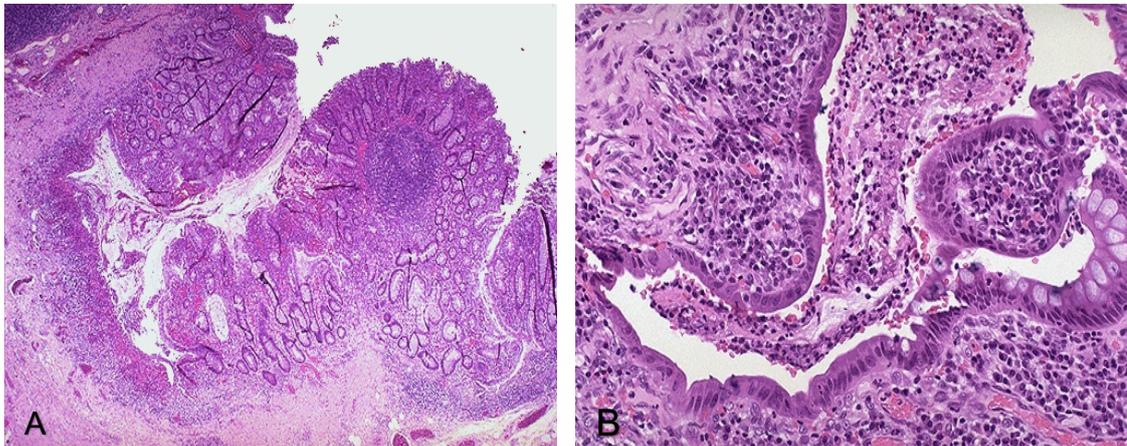


Figura 2: **Padrão inflamatório na retocolite ulcerativa.** Hematoxilina-eosina A: Magnificação 100x. B: Magnificação 400x.

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 da doença (Figura 3-A) quando comparada com as amostras em remissão (Figura 3-B).

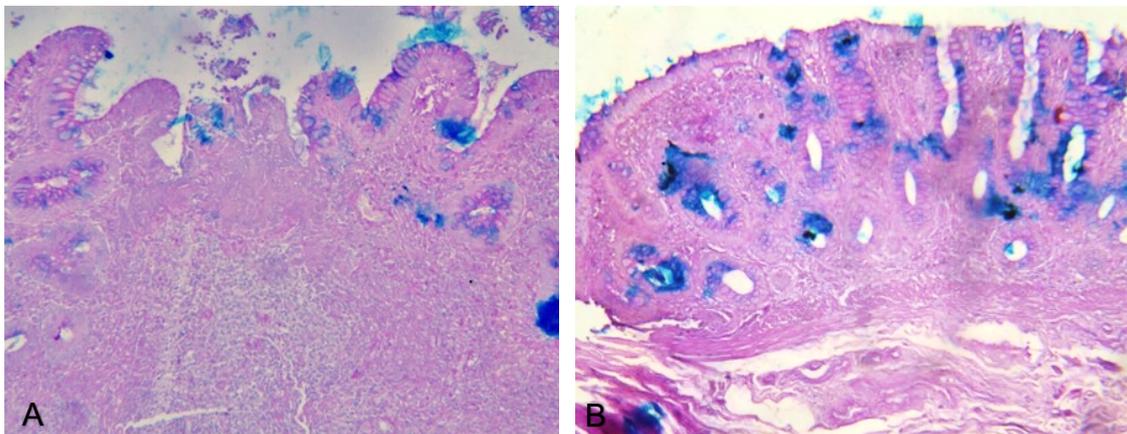


Figura 3: **Distribuição das glicoproteínas na mucosa intestinal.** Depleção das glicoproteínas na mucosa intestinal em retocolite ulcerativa (A) e distribuição normal em tecido normal (B). PAS e Alcian Blue (Magnificação 100x).

Na DC as características histológicas analisadas incluíram: a presença de granulomas, lâmina própria focal ou irregular, inflamação crônica, distorção de cripta focal ou anatomicamente descontínua e superfície mucosa normal.

Um achado histológico relevante na DC é a inflamação transmural. Na Figura 4, as células inflamatórias (os infiltrados azulados) estendem-se da mucosa através

da submucosa e muscular e aparecem como infiltrados nodulares na superfície serosa adjacente à gordura. Nota-se, ainda, a presença de inflamação granulomatosa.

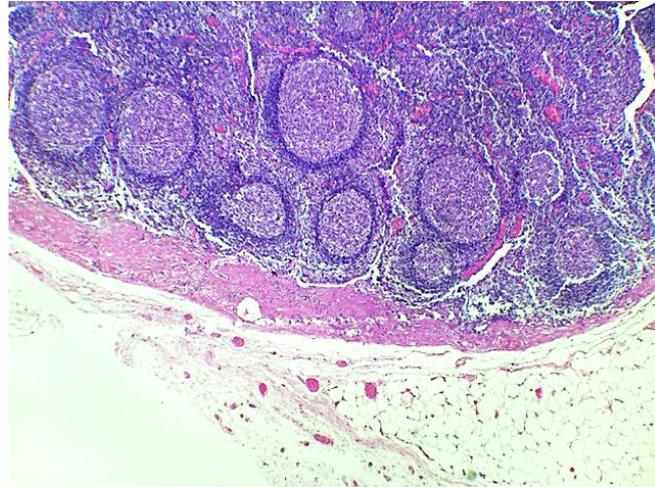


Figura 4: **Placas de Peyer mostrando hiperplasia nodular linfoide e inflamação transmural em doença de Crohn.** Hematoxilina-eosina (Magnificação 100x).

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 neutrófilos agredindo o epitélio glandular as chamadas criptites ou em aglomerados formando microabcessos.

Na análise microscópica em maior aumento, a natureza granulomatosa não-caseosa da inflamação da doença de Crohn é evidenciada por células epitelioides, células gigantes e muitos linfócitos (Figura 5).

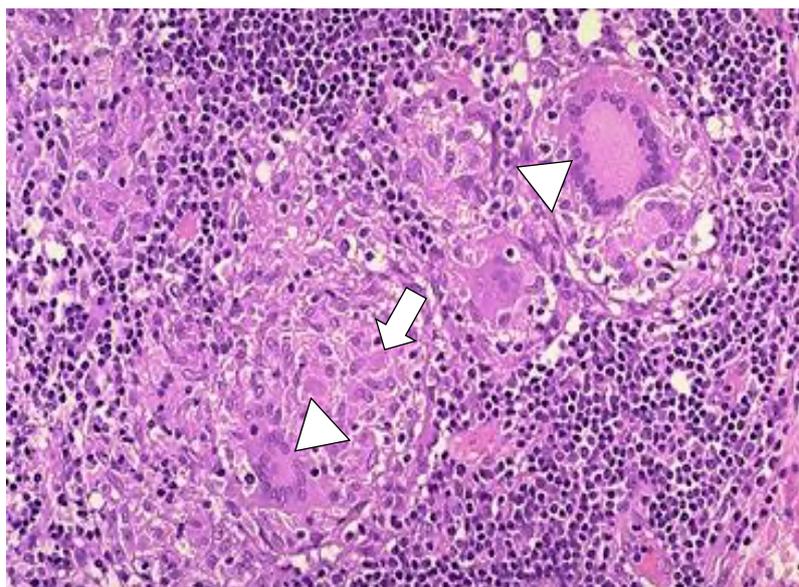


Figura 5: **Inflamação granulomatosa em doença de Crohn.** Infiltrado inflamatório crônico rico em células epitelioides (seta) e células gigantes (cabeça da seta). Hematoxilina-eosina (Magnificação 400x).

### *Análise Histomorfométrica do Colágeno*

O tecido de pacientes com DII é caracterizado por um aumento no colágeno total, bem como aumentos no colágeno tipo III e V, que podem contribuir para enrijecimento da MEC. Produtos de degradação do colágeno produzidos por metaloproteinases (MMPs) são liberados no tecido, onde esses fragmentos da MEC atuam como quimiocinas, capazes de aumentar o recrutamento de neutrófilos [9].

Os produtos de degradação de MMP também estão presentes no soro de pacientes com DII em diferentes níveis de DC e RCU, sugerem que a remodelação da MEC pode ser diferente nesses estados de doença devido às diferenças em populações de leucócitos ou expressão de MMP [9].

A presença do colágeno em amostras de DII pode ser evidenciada a partir de técnicas histoquímicas especiais como Tricrômico de Masson (colágeno tipo I e III na coloração azul) e *Picrosirius red*, onde as fibras tipo I (Figura 6) se apresentam como fibras grossas, altamente birrefringentes e na cor vermelha, enquanto as fibras tipo III se apresentam em feixes finos, com fraca birrefringência e na cor amarelo-esverdeado.

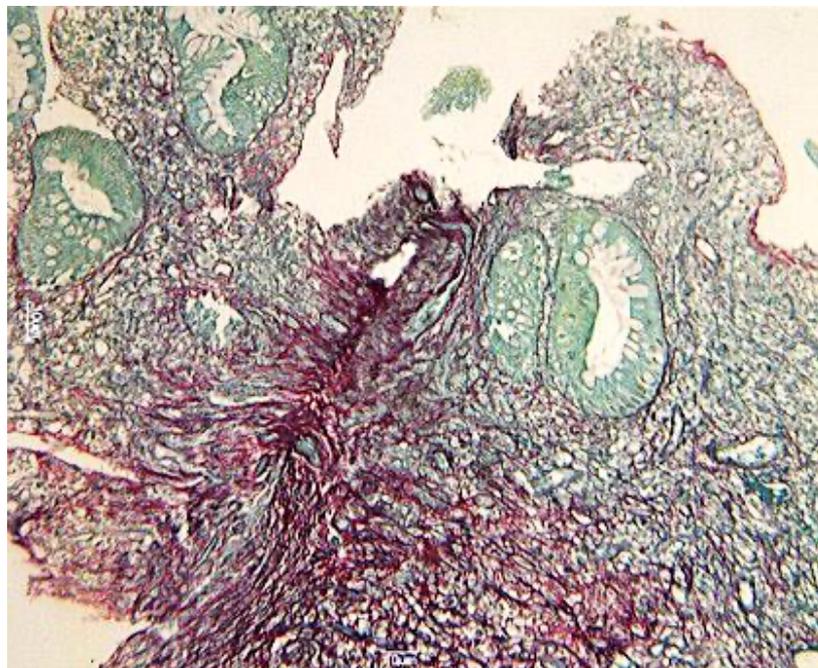


Figura 6: **Disposição das fibras colágenas tipo I em paciente com DC.** As estrias vermelhas evidenciam o colágeno do tipo I. *Picrosirius red* (Magnificação 100x).

Nas fotomicrografias das lâminas coradas por Tricrômico de Masson, capturadas com mesmo aumento óptico, iluminação, resolução, ISO, abertura e

velocidade do obturador da câmera, das regiões centrais nota-se grande quantidade de fibras colágenas de densidade e intensidade variadas (Figura 7), enquanto na histologia intestinal normal, pode-se observar a presença de discretas fibras colágenas permeando as fibras musculares lisas.

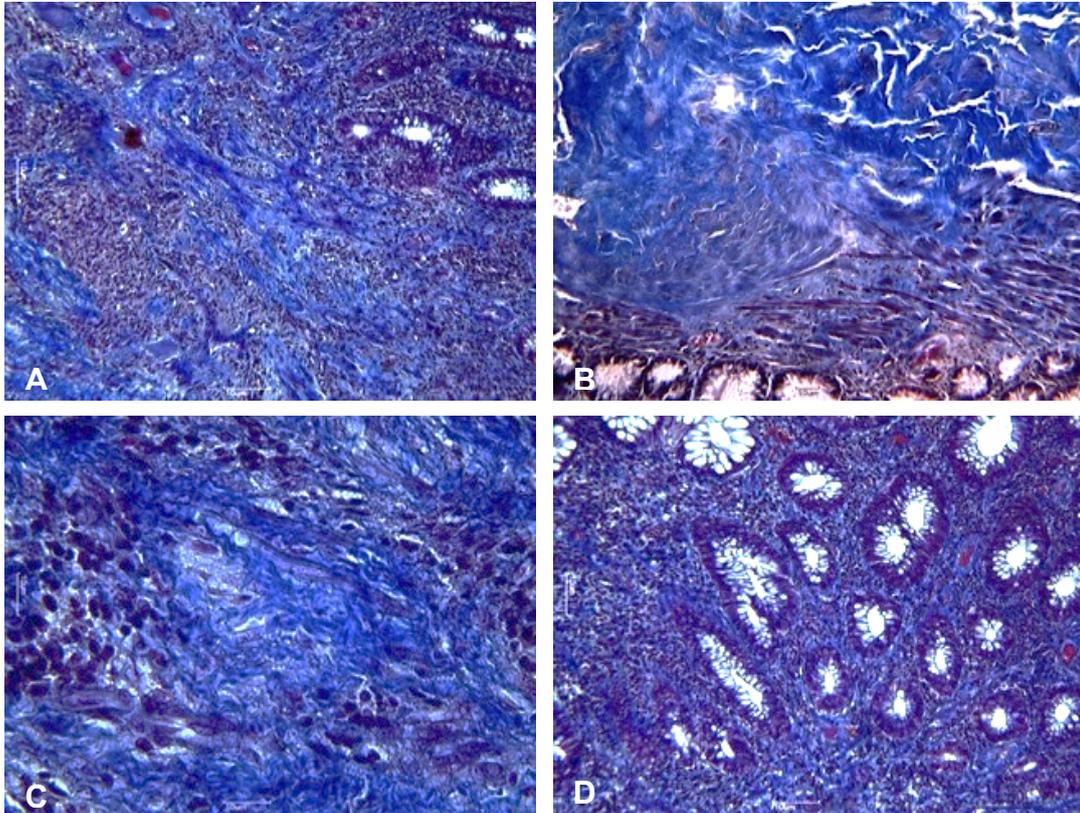


Figura 7: **Fotomicrografias das amostras teciduais para análise do colágeno intersticial em pacientes com doença inflamatória intestinal** A e B: fibras colágenas na matriz extracelular de pacientes com Doença de Crohn. C e D: fibras colágenas na matriz extracelular de pacientes com Retocolite Ulcerativa Tricrômico de Masson (Magnificação 100x).

O processo fibrótico é uma parte da resposta intestinal ao processo de inflamação na DII. A fibrose intestinal é caracterizada pela produção excessiva de componentes da matriz extracelular. A submucosa é uma densa rede de conectivos tecido que consiste em fibroblastos, músculo liso células, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos. Durante a inflamação imune células se infiltram na submucosa, onde podem liberar enzimas que degradam a matriz e iniciar um ciclo de degradação e síntese de matriz extracelular [10].

A análise histopatológica das lesões inflamatórias intestinais indicou a presença de fibras musculares turbilhonadas ou em camadas sobrepostas, permeadas por tecido conjuntivo com uma quantidade variável de vasos sanguíneos e fibroblastos, imersos em uma matriz extracelular abundante, composta predominantemente de

colágeno tipo I e III. Nas amostras de doença ativa, tanto para DC quanto para RCU nota-se ainda um extenso infiltrado inflamatório permeando as fibras de colágeno (Figura 8).

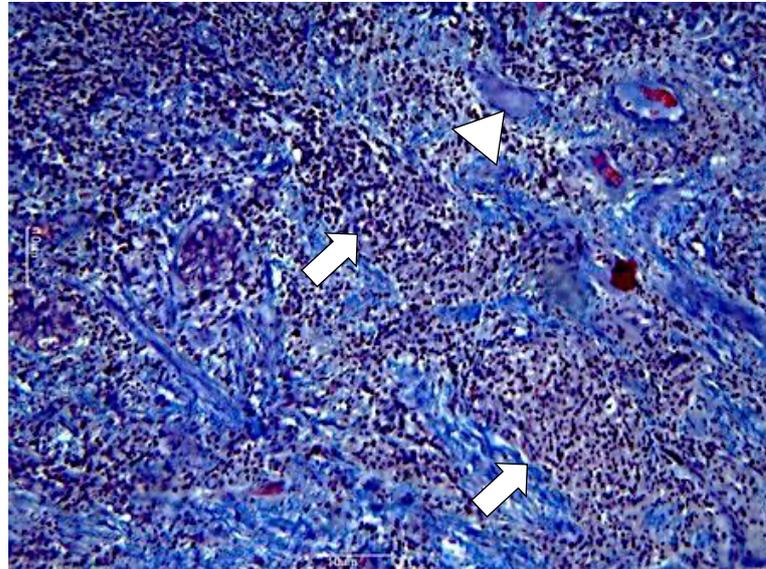


Figura 8: **Fibras colágenas e extenso infiltrado inflamatório em paciente com doença de Crohn ativa.** Observa-se áreas de fibrose e processo inflamatório. Infiltrado inflamatório crônico rico em monomorfonucleares (setas) e presença de célula gigante (cabeça da seta). Tricrômico de Masson (Magnificação 400x).

Após o recorte das áreas de interesse, as tonalidades do colágeno (azul forte e fraco) presentes nas fotomicrografias, a imagem resultante foi então submetida à análise do histograma para quantificação da área média de colágeno intersticial por campo captado. O estudo do histograma indicou que a área média de colágeno nas regiões captadas em pacientes com remissão foi maior que aquelas observadas nas lesões ativas, com  $p < 0,05$  e intervalo de confiança de 95%, entre 3,9 e 54,06% para doença ativa e 27,94 e 84,13% para remissão (Tabela 1) em DC e entre 2,72 e 36,38% para doença ativa e 19,52 e 54,63% para remissão (Tabela 2) em RCU.

Tabela 1: Área média de colágeno intersticial por campo histológico\* em tecido intestinal de pacientes com Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa ativa e em remissão.

	Doença de Crohn Ativa (n=33)		Doença de Crohn Remissão (n=16)	
	micrômetro ( $\mu\text{m}^2$ )	% colágeno	micrômetro ( $\mu\text{m}^2$ )	% colágeno
MÍNIMO	1201,00	3,9%	8604,08	27,94%
MÁXIMO	16647,70	54,06%	25907,72	84,13%
MÉDIO	9500,18	30,85%	17552,53	56,98%

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

Tabela 2: Área média de colágeno intersticial por campo histológico\* em tecido intestinal de pacientes com Retocolite Ulcerativa ativa e em remissão.

	Retocolite Ulcerativa Ativa (n=74)		Retocolite Ulcerativa Remissão (n=31)	
	micrômetro ( $\mu\text{m}^2$ )	% colágeno	micrômetro ( $\mu\text{m}^2$ )	% colágeno
MÍNIMO	837,62	2,72%	6011,15	19,52%
MÁXIMO	11203,17	36,38%	16823,23	54,63%
MÉDIO	5641,07	18,32%	11043,77	35,86%

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

A remodelação da MEC é um processo essencial que inclui a degradação por proteases de moléculas velhas de colágenos, lamininas, elastina e proteoglicanos, que serão posteriormente substituídas por proteínas recém-sintetizadas. Nas DII, a remodelação excessiva da MEC é resultante da inflamação intestinal crônica, que leva a níveis aumentados de degradação e pode resultar em cicatrização inadequada do tecido intestinal, o que pode eventualmente causar formação excessiva de matriz e deposição de tecido, resultando em fibrogênese intestinal [11-13].

Estudos [14-16] indicam que o colágeno tipo VI é crucial para a homeostase da mucosa intestinal, como a perda de colágeno tipo VI aumenta o derramamento e migração de células epiteliais intestinais e resulta em alterações barreira epitelial intraluminal. Nossa análise morfométrica evidenciou uma menor distribuição de colágeno nas amostras teciduais de pacientes com doença ativa o que corrobora com os dados identificados nos estudos citados.

O monitoramento de proteínas presentes na MEC e conseqüentemente os níveis de remodelamento da matriz em pacientes com DII, pode ser capaz de identificar o prognóstico dos pacientes e auxiliar na escolha do segmento farmacoterapêutico mais eficaz para o fenótipo apresentado, já que pacientes com altos índices de remodelamento tendem a ter doença grave e progressiva [17].

#### *Análise Imunoistoquímica da $\beta$ -catenina e a e-caderina*

A mucosa não ulcerada e a mucosa na doença inativa demonstraram a distribuição normal da e-caderina e  $\beta$ -catenina preservada. A expressão dentro do epitélio inflamado sugere a estabilidade deste complexo  $\beta$ -catenina + e-caderina (Figura 9). Por outro lado, alterações na imunorreatividade destas glicoproteínas foram observadas em amostras de pacientes com ulceração da mucosa (Figura 10).

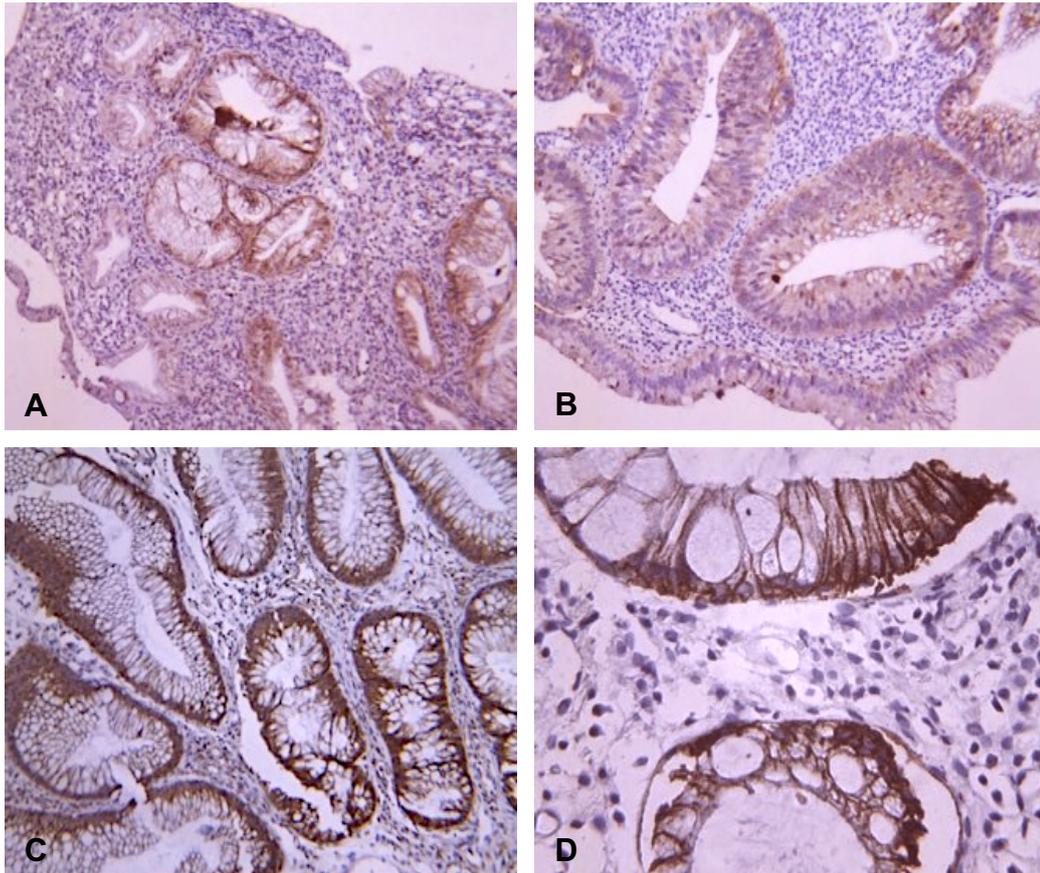


Figura 9: **Comparação entre a expressão tecidual da  $\beta$ -catenina, e-caderina nos grupos com doença inflamatória intestinal ativa.** Nota-se a  $\beta$ -catenina preservada no epitélio de lesões ativas (A) e e-caderina (B) distribuída normalmente pela extensão epitelial em DC ativa. Para RCU a expressão de  $\beta$ -catenina (C) e da e-caderina (D) também estão preservadas. (Magnificação 400x).

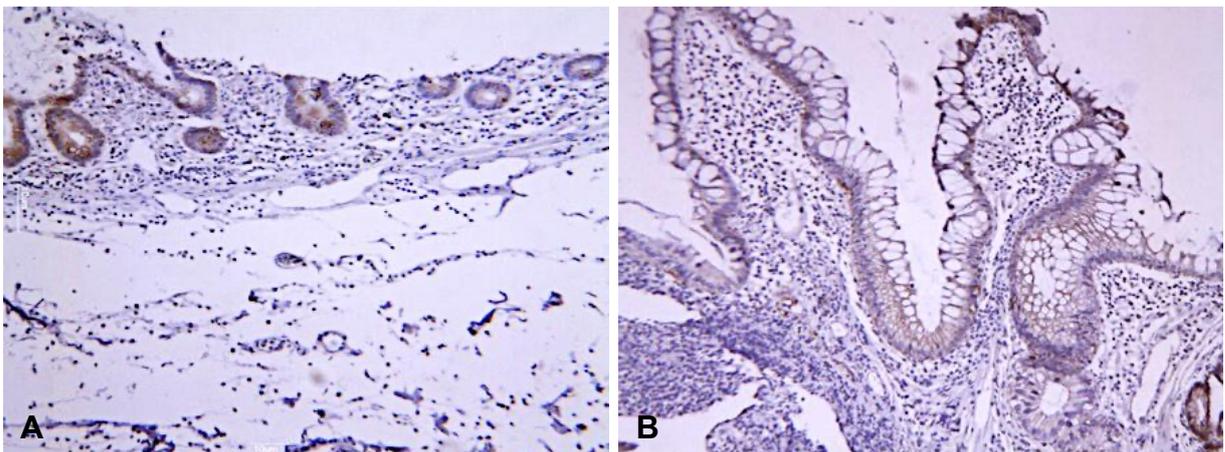


Figura 10: **Comparação entre a expressão tecidual da  $\beta$ -catenina, e-caderina em ulceração da mucosa.** Imureatividade da  $\beta$ -catenina (A) e da e-caderina em lesões ulceradas na RCU (B). (Magnificação 400x)

Existem evidências de que a redução da expressão de e-caderina e o acúmulo de  $\beta$ -catenina citoplasmática estão associados a variáveis clínicas mais agressivas e com um comportamento biológico mais agressivo [18].

Várias linhas de evidência mostram que o complexo e-caderina e  $\beta$ -catenina está associado a manutenção da função de barreira epitelial intestinal. A regulação das vias de sinalização dessas proteínas pode desempenhar um papel fundamental no restabelecimento das propriedades de barreira, um cenário importante para a cura da mucosa e restauração da barreira em DII. No entanto, evidências adicionais a partir de amostras coletadas sistematicamente em diferentes estágios de DII serão necessárias para apoiar o papel da regulação da e-caderina e  $\beta$ -catenina como alvos promissores para a estabilização da função de barreira intestinal nessas doenças. [19,20].

## Conclusões

Durante a remodelação da MEC, os colágenos, lamininas, elastina e proteoglicanos estão sendo degradados por proteases e substituídas por proteínas recém-sintetizadas. Contudo, apesar de ser um processo essencial, o curso clínico da doença inflamatória intestinal impulsiona uma remodelação excessiva da MEC. A avaliação dos componentes da MEC, em especial o colágeno, pode funcionar como um indicador da saúde e integridade das funções da mucosa e da barreira intestinal.

A evidência de que a desregulação da adesão e comprometimento do complexo e-caderina e  $\beta$ -catenina contribuem para a patogênese da DII ao prejudicar as propriedades da barreira epitelial intestinal já se encontra bem consolidada na literatura médica. Contudo, novos estudos nesse campo são essenciais para caracterização adicional dos mecanismos subjacentes e estabelecimento de novas abordagens terapêuticas para os pacientes a partir desses achados.

## Referências

- [1] DERKACZ, Alicja et al. The Role of Extracellular Matrix Components in Inflammatory Bowel Diseases. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 5, p. 1122, 2021.
- [2] RODA, Giulia et al. Crohn's disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 6, n. 1, p. 1-19, 2020.
- [3] TAKU, Kobayashi et al. Ulcerative colitis (Primer). **Nature Reviews: Disease Primers**, v. 6, n. 1, 2020.
- [4] ONFROY-ROY, Lauriane et al. Extracellular matrix mechanical properties and regulation of the intestinal stem cells: when mechanics control fate. **Cells**, v. 9, n. 12, p. 2629, 2020.
- [5] GIUFFRIDA, Paolo; DI SABATINO, Antonio. Targeting T cells in inflammatory bowel disease. **Pharmacological Research**, v. 159, p. 105040, 2020.

- [6] LU, Jiayi et al. M1 Macrophage exosomes MiR-21a-5p aggravates inflammatory bowel disease through decreasing E-cadherin and subsequent ILC2 activation. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 25, n. 6, p. 3041-3050, 2021.
- [7] SHENG, Yong Hua et al. A nucleotide analog prevents colitis-associated cancer via beta-catenin independently of inflammation and autophagy. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 1, p. 33-53, 2021.
- [8] BANDYOPADHYAY, Chiroosree; SCHECTERSON, Leslayann; GUMBINER, Barry. P150 Enhancing epithelial barrier function with novel e-cadherin activating monoclonal antibodies reduces inflammatory bowel disease progression in mouse models. **Gastroenterology**, v. 158, n. 3, p. S47, 2020.
- [9] SINA, Christian; KEMPER, Claudia; DERER, Stefanie. The intestinal complement system in inflammatory bowel disease: Shaping intestinal barrier function. In: **Seminars in immunology**. Academic Press, 2018. p. 66-73.
- [10] PETREY, Aaron C.; CAROL, A. The extracellular matrix in IBD: a dynamic mediator of inflammation. **Current opinion in gastroenterology**, v. 33, n. 4, p. 234, 2017.
- [11] KOELINK, Pim J. et al. Collagen degradation and neutrophilic infiltration: a vicious circle in inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 63, n. 4, p. 578-587, 2014.
- [12] HUNDORFEAN, Gheorghe; NEURATH, Markus F.; SITARU, Cassian. Autoimmunity against type VII collagen in inflammatory bowel disease. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 14, n. 10, p. 2393-2403, 2010.
- [13] KOUTROUBAKIS, I. E. et al. Serum laminin and collagen IV in inflammatory bowel disease. **Journal of clinical pathology**, v. 56, n. 11, p. 817-820, 2003.
- [14] STEWART, Daniel C. et al. Quantitative assessment of intestinal stiffness and associations with fibrosis in human inflammatory bowel disease. **PLoS One**, v. 13, n. 7, p. e0200377, 2018.
- [15] MORTENSEN, J. H. et al. The intestinal tissue homeostasis—the role of extracellular matrix remodeling in inflammatory bowel disease. **Expert review of gastroenterology & hepatology**, v. 13, n. 10, p. 977-993, 2019.
- [16] HUSSEY, George S.; CRAMER, Madeline C.; BADYLAK, Stephen F. Extracellular matrix bioscaffolds for building gastrointestinal tissue. **Cellular and molecular gastroenterology and hepatology**, v. 5, n. 1, p. 1-13, 2018.
- [17] KIROV, Stefan et al. Degradation of the extracellular matrix is part of the pathology of ulcerative colitis. **Molecular omics**, v. 15, n. 1, p. 67-76, 2019.
- [18] PETERS, Lauren A. et al. A functional genomics predictive network model identifies regulators of inflammatory bowel disease. **Nature genetics**, v. 49, n. 10, p. 1437-1449, 2017.
- [19] LANGER, Victoria et al. IFN- $\gamma$  drives inflammatory bowel disease pathogenesis through VE-cadherin-directed vascular barrier disruption. **The Journal of clinical investigation**, v. 129, n. 11, p. 4691-4707, 2019.
- [20] SCHLEGEL, Nicolas; BOERNER, Kevin; WASCHKE, Jens. Targeting desmosomal adhesion and signalling for intestinal barrier stabilization in inflammatory bowel diseases—Lessons from experimental models and patients. **Acta physiologica**, v. 231, n. 1, p. e13492, 2021.

## 7 CONCLUSÕES FINAIS

- Estudos epidemiológicos brasileiros consistentes e robustos acerca das doenças inflamatórias intestinais ainda são escassos na literatura médica, mas nota-se estatísticas crescentes nas plataformas de monitoramento, como por exemplo o DATASUS e em estudos com populações isoladas. **No presente estudo, apesar dos hospitais públicos onde as coletas foram realizadas receberem pacientes de todo o estado de Pernambuco, a amostragem não é significativa e determinante para novas conclusões epidemiológicas. Contudo, o perfil apresentado em relação as médias de idade, sexo e hábitos estão de acordo com os principais achados em populações norte-americanas, europeias e orientais.**

- O resultado da análise histoquimiluminescente da calprotectina reforça o papel crucial desse biomarcador para avaliação do curso clínico das doenças inflamatórias intestinais. **As diferenças entre os grupos com doença ativa, em remissão e nos controles tanto para doença de Crohn como para retocolite ulcerativa foram estatisticamente significativas. Nesse aspecto, cabe ainda ressaltar a sensibilidade e acurácia do ensaio histoquimiluminescente na detecção de valores expressivos para calprotectina, ADAM 10 e 15 mesmo em pequenas amostras de tecido intestinal.** Sendo uma alternativa promissora na detecção precoce deste e de outros biomarcadores não apenas em amostras teciduais, mas em outras amostras biológicas.

- As proteases ADAM10 e ADAM15 participam das vias de sinalização que regulam a homeostase intestinal e renovação tecidual. **Nos grupos de doença ativa, tanto em doença de Crohn quanto em retocolite ulcerativa, os valores dessas proteases foram mais expressivos, evidenciando possíveis tentativas de restabelecimento da homeostase intestinal e regeneração nas áreas de lesão.** Estudos adicionais são necessários para definir o papel da família ADAM em células intestinais de pacientes acometidos por doença inflamatória intestinal.

- A avaliação dos componentes da matriz extracelular, através da quantificação do colágeno e do complexo e-caderina e  $\beta$ -catenina, funcionam como indicadores da saúde e integridade do epitélio e da mucosa gastrointestinal. Sabe-se que a

desregulação da adesão e o comprometimento da barreira intraluminal contribuem significativamente para a patogênese das doenças inflamatórias intestinais. **Os achados deste estudo, reforçam inclusive o papel da matriz extracelular nos diferentes fenótipos, sendo as lesões na doença de Crohn descontínua e transmural e na retocolite ulcerativa superficiais e contínua.**

- A compreensão do papel da matriz extracelular e a identificação de biomarcadores inflamatórios expande os conhecimentos na fisiopatologia da doença de Crohn e da retocolite ulcerativa, corroborando não apenas para metodologias diagnósticas mais eficientes e precoces, mas também para novas possibilidades terapêuticas com fármacos imunobiológicos.

## REFERÊNCIAS

Abraham, B. P.; Ahmed, T.; Ali, T. Inflammatory bowel disease: pathophysiology and current therapeutic approaches. **Gastrointestinal Pharmacology**, p. 115-146, 2017.

Abu-Sbeih, H. et al. Immune checkpoint inhibitor therapy in patients with preexisting inflammatory bowel disease. **Journal of Clinical Oncology**, v. 38, n. 6, p. 576, 2020.

Al-Ghadban, S. et al. Cross-talk between intestinal epithelial cells and immune cells in inflammatory bowel disease. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2016.

Algaba, A. et al. Extraintestinal manifestations in patients with inflammatory bowel disease: Study based on the ENEIDA registry. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 66, n. 6, p. 2014-2023, 2021.

Araújo-Filho, J. L. S. Detecção de galectina-3 por imunoquimiluminescência em tecidos tumorais da próstata e tireóide. 2011. 102 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

Babendreyer, A. et al. The metalloproteinase ADAM15 is upregulated by shear stress and promotes survival of endothelial cells. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 134, p. 51-61, 2019.

Basso, D.; Zambon, C. F.; Plebani, M. Inflammatory bowel diseases: from pathogenesis to laboratory testing. **Clinical chemistry and laboratory medicine**, v. 52, n. 4, p. 471-481, 2014.

Benchimol, E. I. et al. Incidence, Outcomes, and Health Services Burden of Very Early Onset Inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology**, v. 147, n. 4, p. 803–813, 2014.

Boden, E. K. et al. Identification of candidate biomarkers associated with response to vedolizumab in inflammatory bowel disease. **Digestive diseases and sciences**, v. 63, n. 9, p. 2419-2429, 2018.

Boyapati, R. K. et al. Gut mucosal DAMPs in IBD: from mechanisms to therapeutic implications. **Mucosal immunology**, v. 9, n. 3, p. 567-582, 2016.

Bromke, M. A. et al. Faecal Calprotectin in Assessment of Mucosal Healing in Adults with Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis. **Journal of clinical medicine**, v. 10, n. 10, p. 2203, 2021.

Brown, R. C. et al. Development and application of a novel acridinium ester for use as a chemiluminescent emitter in nucleic acid hybridisation assays using chemiluminescence quenching. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 7, n. 2, p. 386–394, 2009.

Burke, J. P. et al. Transcriptomic analysis of intestinal fibrosis-associated gene expression in response to medical therapy in Crohn's disease. **Inflammatory bowel diseases**, v. 14, n. 9, p. 1197-1204, 2008.

Burri, E. et al. Monoclonal antibody testing for fecal calprotectin is superior to polyclonal testing of fecal calprotectin and lactoferrin to identify organic intestinal disease in patients with abdominal discomfort. **Clinica Chimica Acta**, v. 416, p. 41–47, 2013.

Calixto, R. P.; Flores, C.; Francesconi, C. F. Inflammatory bowel disease: impact on scores of quality of life, depression and anxiety in patients attending a tertiary care center in Brazil. **Arquivos de gastroenterologia**, v. 55, p. 202-207, 2018.

Caruso, R.; Lo, B. C.; Núñez, G. Host–microbiota interactions in inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 7, p. 411-426, 2020.

Chen, P. et al. Serum biomarkers for inflammatory bowel disease. **Frontiers in medicine**, v. 7, p. 123, 2020.

Conrad, M. A. et al. Distinct histopathological features at diagnosis of very early onset inflammatory bowel disease. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 13, n. 5, p. 615-625, 2019.

Conrad, K.; Roggenbuck, D.; Laass, M. W. Diagnosis and classification of ulcerative colitis. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. 4-5, p. 463–466, 2014.

Crowe, A. R.; Yue, W. Semi-quantitative determination of protein expression using immunohistochemistry staining and analysis: an integrated protocol. **Bio-protocol**, v. 9, n. 24, 2019.

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

Daulagala, A. C.; Bridges, M. C.; Kourtidis, A. E-cadherin beyond structure: a signaling hub in colon homeostasis and disease. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 11, p. 2756, 2019.

de Campos Silva, E. F. et al. Risk factors for ulcerative colitis-associated colorectal cancer: A retrospective cohort study. **Medicine**, v. 99, n. 32, 2020.

Feurstein, J. D.; Cheifetz, A. S. Crohn disease: epidemiology, diagnosis, and management. In: **Mayo Clinic Proceedings**. Elsevier, 2017. p. 1088-1103.

Friedrich, M.; Pohin, M.; Powrie, F. Cytokine networks in the pathophysiology of inflammatory bowel disease. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 992-1006, 2019.

Fukunaga, S. et al. Detection of calprotectin in inflammatory bowel disease: Fecal and serum levels and immunohistochemical localization. **International journal of molecular medicine**, v. 41, n. 1, p. 107-118, 2018.

Gajendran, M. et al. A comprehensive review and update on Crohn's disease. **Disease-a-month**, v. 64, n. 2, p. 20-57, 2018.

Garber, A.; Regueiro, M. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease: epidemiology, etiopathogenesis, and management. **Current gastroenterology reports**, v. 21, n. 7, p. 1-13, 2019.

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

Gasparini, R. G.; Sssaki, L. Y.; Saad-Hossne, R. Inflammatory bowel disease epidemiology in São Paulo state, Brazil. **Clinical and experimental gastroenterology**, v. 11, p. 423, 2018.

Glassner, K. L.; Abraham, B. P.; Quigley, E. M. The microbiome and inflammatory bowel disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 145, n. 1, p. 16-27, 2020.

Goffin, L. et al. Anti-MMP-9 antibody: a promising therapeutic strategy for treatment of inflammatory bowel disease complications with fibrosis. **Inflammatory bowel diseases**, v. 22, n. 9, p. 2041-2057, 2016.

Gordon, I. O. et al. Histopathology scoring systems of stenosis associated with small bowel Crohn's disease: a systematic review. **Gastroenterology**, v. 158, n. 1, p. 137-150. e1, 2020.

Graham, D. B.; Xavier, R. J. Pathway paradigms revealed from the genetics of inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 578, n. 7796, p. 527-539, 2020.

Greuter, T. et al. Gender differences in inflammatory bowel disease. *Digestion*, v. 101, n. 1, p. 102-108, 2020.

Greuter, T.; Vavricka, S. R. Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease—epidemiology, genetics, and pathogenesis. **Expert review of gastroenterology & hepatology**, v. 13, n. 4, p. 307-317, 2019.

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

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

Hazel, K.; O'Connor, A. Emerging treatments for inflammatory bowel disease. **Therapeutic advances in chronic disease**, v. 11, p. 2040622319899297, 2020.

Holmberg, F. E. O. et al. Intestinal barrier integrity and inflammatory bowel disease: Stem cell-based approaches to regenerate the barrier. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 12, n. 4, p. 923-935, 2018.

Jairath, V.; Feagan, B. G. Global burden of inflammatory bowel disease. **The Lancet Gastroenterology & Hepatology**, v. 5, n. 1, p. 2-3, 2020.

Johnson, L. M.; White, S. K.; Schmidt, R. L. Are calprotectin and lactoferrin equivalent screening tests for inflammatory bowel disease?. **Clinica Chimica Acta**, v. 510, p. 191-195, 2020.

Kaplan, G. G.; Windsor, J. W. The four epidemiological stages in the global evolution of inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 18, n. 1, p. 56-66, 2021.

Kayal, M.; Shah, S. Ulcerative colitis: current and emerging treatment strategies. **Journal of clinical medicine**, v. 9, n. 1, p. 94, 2020.

Kessel, C. et al. Serum biomarkers confirming stable remission in inflammatory bowel disease. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2021.

Kessler, S. et al. Hyaluronan (HA) deposition precedes and promotes leukocyte recruitment in intestinal inflammation. **Clinical and translational science**, v. 1, n. 1, p. 57-61, 2008.

Khaki-Khatibi, F. et al. Calprotectin in inflammatory bowel disease. **International Journal of Clinical Chemistry**, v. 510, p. 556, 2020.

Khalili, H. et al. The role of diet in the aetiopathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 15, n. 9, p. 525-535, 2018.

Kim, Y.; Pritts, T. A. The gastrointestinal tract. In: **Geriatric Trauma and Critical Care**. Springer, Cham, 2017. p. 35-43.

Krystek-Korpacka, M. et al. Biochemical biomarkers of mucosal healing for inflammatory bowel disease in adults. **Diagnostics**, v. 10, n. 6, p. 367, 2020.

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

Langer, V. et al. IFN- $\gamma$  drives inflammatory bowel disease pathogenesis through VE-cadherin-directed vascular barrier disruption. **The Journal of clinical investigation**, v. 129, n. 11, p. 4691-4707, 2019.

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

Lavelle, A.; Sokol, H. Gut microbiota-derived metabolites as key actors in inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 17, n. 4, p. 223-237, 2020.

Lee, J. M. et al. A comparison of diagnostic performance between two quantitative rapid fecal calprotectin assays in detecting active inflammatory bowel disease. **Plos one**, v. 16, n. 8, p. e0255974, 2021.

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

Ma, T. et al. Preparation of an acridinium ester-labeled antibody and its application in goldmag nanoparticle-based, ultrasensitive chemiluminescence immunoassay for the detection of human epididymis protein 4. **Micromachines**, v. 8, n. 5, p. 149, 2017.

Mak, W. Y. et al. The epidemiology of inflammatory bowel disease: East meets west. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 35, n. 3, p. 380-389, 2020.

Manon-Jensen, T. et al. Elevated ectodomain of type 23 collagen is a novel biomarker of the intestinal epithelium to monitor disease activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. **United European Gastroenterology Journal**, v. 1, p. 1-11, 2020.

Marotto, D. et al. Extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel diseases. **Pharmacological Research**, p. 105206, 2020.

Michael, M., Yap, A. S. The regulation and functional impact of actin assembly at cadherin cell–cell adhesions. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2013. p. 298-307.

Moriggi, M. et al. Contribution of extracellular matrix and signal mechanotransduction to epithelial cell damage in inflammatory bowel disease patients: a proteomic study. **Proteomics**, v. 17, n. 23-24, p. 1700164, 2018.

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

Nanini, H. F. et al. Damage-associated molecular patterns in inflammatory bowel disease: From biomarkers to therapeutic targets. **World journal of gastroenterology**, v. 24, n. 41, p. 4622, 2018.

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

Ng, S. C. et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. **The Lancet**, v. 390, n. 10114, p. 2769-2778, 2017.

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

Petrey, A. C.; Carol, A. The extracellular matrix in IBD: a dynamic mediator of inflammation. **Current opinion in gastroenterology**, v. 33, n. 4, p. 234, 2017.

Quaresma, A. B.; Kaplan, G. G.; Kotze, P. G. The globalization of inflammatory bowel disease: the incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in Brazil. **Current opinion in gastroenterology**, v. 35, n. 4, p. 259-264, 2019.

Rabbenou, W.; Ullman, T. A. Risk of colon cancer and recommended surveillance strategies in patients with ulcerative colitis. **Gastroenterology Clinics**, v. 49, n. 4, p. 791-807, 2020.

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

Roda, A., Seidel, M., Niessner, R. **Chemiluminescence and Bioluminescence: Past, Present and Future**. 1. ed. 2011. 289-333 p. ISBN 978-1-84973-202-4.

Roda, G. et al. Crohn's disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 6, n. 1, p. 1-19, 2020.

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

Saha, N. et al. ADAM proteases: emerging role and targeting of the non-catalytic domains. **Cancer letters**, v. 467, p. 50-57, 2019.

Schofield, J. B.; Haboubi, N. I, Najib. Histopathological mimics of inflammatory bowel disease. **Inflammatory bowel diseases**, v. 26, n. 7, p. 994-1009, 2020.

Seegar, T. C. M. et al. Structural basis for regulated proteolysis by the  $\alpha$ -secretase ADAM10. **Cell**, v. 171, n. 7, p. 1638-1648. e7, 2017.

Sina, C., Kemper, C., Derer, S. The intestinal complement system in inflammatory bowel disease: Shaping intestinal barrier function. In: **Seminars in immunology**. Academic Press, 2018. p. 66-73.

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

Sulz, M. C. et al. Treatment algorithms for Crohn's disease. **Digestion**, v. 101, n. 1, p. 42-56, 2020.

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

Taku, K. et al. Ulcerative colitis (Primer). **Nature Reviews: Disease Primers**, v. 6, n. 1, 2020.

Toquet, C. et al. ADAM15 to  $\alpha 5\beta 1$  integrin switch in colon carcinoma cells: a late event in cancer progression associated with tumor dedifferentiation and poor prognosis. **International journal of cancer**, v. 130, n. 2, p. 278-287, 2012.

Torlakovic, E. E. et al. Evolution of quality assurance for clinical immunohistochemistry in the era of precision medicine. Part 3: technical validation of immunohistochemistry (IHC) assays in clinical IHC laboratories. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 25, n. 3, p. 151-159, 2017.

Torres, J. et al. The gut microbiota, bile acids and their correlation in primary sclerosing cholangitis associated with inflammatory bowel disease. **United European gastroenterology journal**, v. 6, n. 1, p. 112-122, 2018.

Van Der Giessen, J. et al. A direct effect of sex hormones on epithelial barrier function in inflammatory bowel disease models. **Cells**, v. 8, n. 3, p. 261, 2019.

Vasconcelos, R. S. et al. Qualidade de vida de pacientes com doença inflamatória intestinal: revisão integrativa. **ESTIMA, Brazilian Journal of Enterostomal Therapy**, v. 16, p. e2118, 2018.

Viola, A. et al. Diagnostic accuracy of faecal calprotectin in a symptom-based algorithm for early diagnosis of inflammatory bowel disease adjusting for differential verification bias using a Bayesian approach. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 55, n. 10, p. 1176-1184, 2020.

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

WETZEL, Sebastian; SEIPOLD, Lisa; SAFTIG, Paul. The metalloproteinase ADAM10: a useful therapeutic target?. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1864, n. 11, p. 2071-2081, 2017.

Yangyang, R. Y.; Rodriguez, J. R. Clinical presentation of Crohn's, ulcerative colitis, and indeterminate colitis: Symptoms, extraintestinal manifestations, and disease phenotypes. In: **Seminars in pediatric surgery**. WB Saunders, 2017. p. 349-355.

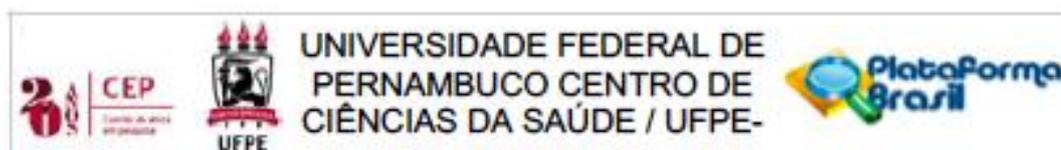
Yantiss, R. K., Odze, R. D. Diagnostic difficulties in inflammatory bowel disease pathology. **Histopathology**, v. 48, n. 2, p. 116–132, 2006.

Zhao, H. et al. Ultrasensitive chemiluminescence immunoassay with enhanced precision for the detection of cTnI amplified by acridinium ester-loaded microspheres and internally calibrated by magnetic fluorescent nanoparticles. **Nanoscale**, v. 13, n. 5, p. 3275-3284, 2021.

Zhou, G. X.; Liu, Z. J. Potential roles of neutrophils in regulating intestinal mucosal inflammation of inflammatory bowel disease. **Journal of digestive diseases**, v. 18, n. 9, p. 495-503, 2017.

## ANEXOS

## ANEXO I



**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 KEIZO 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) 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, melhorando assim a qualidade de vida dos portadores das Doenças Inflamatórias Intestinais.

**Endereço:** Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

**Bairro:** Cidade Universitária

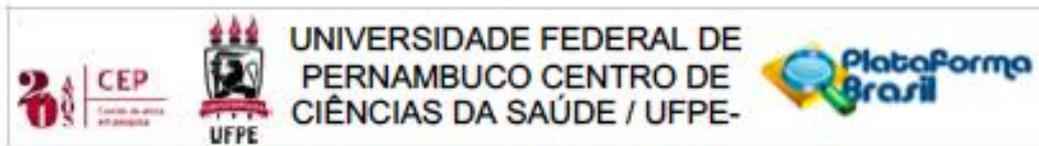
**CEP:** 50.740-600

**UF:** PE

**Município:** RECIFE

**Telefone:** (81)2126-8588

**E-mail:** cepeccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.955.690

**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:**

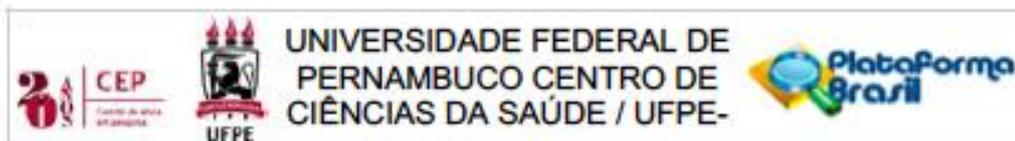
Não há pendências.

**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).

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



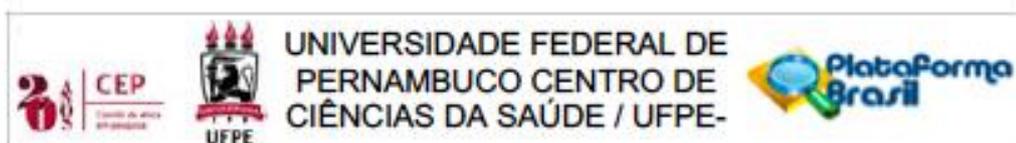
Continuação do Parecer: 1.955.690

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, 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_BÁSICAS_DO_PROJETO_855016.pdf	23/01/2017 11:06:24		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoestradoetica.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	lattesanapaula.pdf	20/01/2017 00:09:37	ANTHONY ALVES DOS SANTOS JUNIOR	Aceito

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: cepcos@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.955.690

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	anuenciahcc.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)

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: cepcca@ufpe.br

## ANEXO II

## Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Prezado(a) paciente,

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

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

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

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

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

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

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

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

Atenciosamente,



Mario Ribeiro de MELO-JÚNIOR

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

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

---

Nome do paciente

## ANEXO III

## Questionário Sociodemográfico

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

ANEXO IV  
 Atividades desenvolvidas durante o Doutorado  
 (2017 - 2021)

Produção Científica:

Rosas, E. P., Costa, R. F., Paz, S. T., **da Silva, A. P. F.**, de Freitas, M. F. L., & Valença, M. M. (2018). Mecanismos farmacológicos do topiramato na profilaxia e tratamento da enxaqueca: uma revisão. *Headache*, 9(4), 190-195.

**SILVA, A. P. F.** Immunochemiluminescent Detection of Calprotectin S100A8/A9 in Ulcerative Colitis In: 2º Congresso Brasileiro de Doenças Inflamatórias Intestinais, 2019, Campinas. 2º Congresso Brasileiro de Doenças Inflamatórias Intestinais. (Apresentação Oral) 2019.

ROSAS, E. P.; PAZ, SILVANIA TAVARES; SOUZA NETA, A. C.; COSTA, R. F.; **SILVA, A. P. F.**; FREITAS, M. F. L.; VALENCA, M. M. Histomorphometric analysis of mast cells in different regions of human intracranial dura In: International Symposium on Diagnostics and Therapeutics (SINATER X), 2019, Recife. SINATER., 2019. v.X.

PAZ, SILVANIA TAVARES; ROSAS, E. P.; **SILVA, A. P. F.**; PAES, F. L. A.; MEDEIROS, P. L. Estabelecimento e Otimização do Protocolo para o Processamento Histológico Manual In: XXI Congresso Brasileiro de Histotecnologia, 2019, Fortaleza. XXI Congresso Brasileiro de Histotecnologia., 2019.

Rosas, E. P., Paz, S. T., de Souza Neta, A. C., Costa, R. F., **da Silva, A. P. F.**, de Freitas, M. F. L., & Valença, M. M. (2019). Histomorphometric analysis of mast cells in different regions of human intracranial dura mater. *Headache Medicine*, 60-62.

SANTOS, E. R. R. dos; VALENÇA, M. M.; LEITE, Antonio Flaudiano Bem; MELLO, L. A; **SILVA, A. P. F.**; LAURENTINO, I. M. S.; SILVA, V. N. C.; GODOI, A. L. ENXAQUECA: evidências de um problema da Saúde Coletiva. Curitiba: EDITORA CRV, 2019, v.1. p.109.

**da Silva, A. P. F.**, de Albuquerque Mello, L., da Fonseca, E. M. S., de Lima, L. E., Maranhão, L. J. A., Alves, N. M. L. C., ... & de Melo Júnior, M. R. (2021). Aspectos Nutricionais Associados a Patogênese das Doenças Inflamatórias Intestinais: uma Revisão Sistemática. *Brazilian Journal of Health Review*, 4(4), 17329-17350.

Estágio em docência:

ORIENTADOR: **Prof. Dr. Mario Ribeiro de Melo Junior**

DISCIPLINA DO ESTÁGIO: **PROCESSOS PATOLÓGICOS GERAIS**

RESPONSÁVEL PELA DISCIPLINA: **Prof. Dra. Adriana Maria da Silva Telles**  
**Prof. Dr. Mario Ribeiro de Melo Junior**

PERÍODO DE ESTÁGIO: **Agosto – Dezembro 2018**  
**Fevereiro – Junho 2019**