

**ANA PAULA PAIVA MOREIRA**

**ESTUDO COMPARATIVO DAS EXPRESSÕES DE  
TNF-alfa, IL1-beta e IL-8 NA MUCOSA ILEAL  
DE PORTADORES DE DOENÇA DE CROHN EM  
USO DE MESALAZINA OU AZATIOPRINA**

**CAMPINAS**

**Unicamp**

**2009**

**ANA PAULA PAIVA MOREIRA**

**ESTUDO COMPARATIVO DAS EXPRESSÕES DE  
TNF-alfa, IL1-beta e IL-8 NA MUCOSA ILEAL  
DE PORTADORES DE DOENÇA DE CROHN EM  
USO DE MESALAZINA OU AZATIOPRINA**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação  
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas para obtenção de título de Mestre  
em Cirurgia, área de concentração em Cirurgia.

**ORIENTADOR: DR. CLÁUDIO SADDY RODRIGUES COY**

**CAMPINAS**

**Unicamp**

**2009**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

M813e      Moreira, Ana Paula Paiva  
Estudo comparativo das expressões de TNF-alfa, ILI-beta e IL-8 na mucosa ileal de portadores de doença de Crohn em uso de mesalazina ou azatioprina / Ana Paula Paiva Moreira. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientador : Cláudio Saddy Rodrigues Coy  
Dissertação ( Mestrado ) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Doença de Crhon. 2. Cirurgia. 3. Azatioprina. I. Coy, Cláudio Saddy Rodrigues. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : TNF-alfa, IL1-beta and IL-8 expressions in ileal mucosa of Crohn's disease patients using mesalazine or azathioprine**

**Keywords:** • Crohn Disease  
• Surgery  
• Azathioprine

**Titulação: Mestrado em Cirurgia**

**Área de Concentração: Cirurgia**

**Banca examinadora:**

**Profº. Drº. Claudio Saddy Rodrigues Coy**

**Profª. Drª. Raquel Franco Leal**

**Profº. Drº. Luiz Henrique Cury Saad**

**Data da defesa: 29-07-2009**

---

## Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Ana Paula Paiva Moreira

---

---

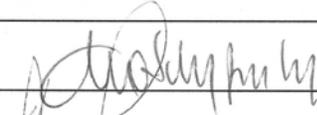
Orientador: Prof. Dr. Claudio Saddy Rodrigues Coy

---

---

### Membros:

---

1. Prof. Dr. Claudio Saddy Rodrigues Coy - 

2. Prof. Dr. Luiz Henrique Cury Saad - 

3. Profa. Dra. Raquel Franco Leal - 

---

Curso de Pós-Graduação do Programa em Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

Data: 29/07/2009

---

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho a muitos...*

*Aos pacientes com Crohn, que conhecem como ninguém as dificuldades e sofrimentos,*

*Àqueles que tiveram a infelicidade de conhecer nesta doença o limite da medicina,*

*e que partiram ...*

*Aos familiares dos doentes, especialmente às suas mães,*

*Aos profissionais da saúde: enfermeiros, pesquisadores, nutricionistas, psicólogos e médicos que tentam de alguma forma ajudar.*

*Aos meus pais, meus companheiros, que fizeram com que eu me tornasse o que sou hoje,*

*Ao meu mestre, Dr. Ricardo Góes , capaz de despertar em mim, a paixão por este mistério...*

*A Deus , o único capaz de um dia nos fornecer a chave para a descoberta; a cura.*

## AGRADECIMENTOS

---

Ao meu orientador, Professor Doutor Cláudio Saddy Rodrigues Coy, pela possibilidade de realização deste trabalho, pela paciência, persistência e disponibilidade.

Ao Professor Doutor João José Fagundes, pela contribuição em minha formação profissional, sempre incentivando o estudo e o aperfeiçoamento médico.

À Professora Doutora Maria de Lourdes Setsuko Ayrizono, pela contribuição na minha formação pelo incentivo e companheirismo.

À Professora Doutora Raquel Franco Leal, pelo incentivo na realização deste trabalho e pela ajuda e disponibilidade.

Aos Professores Doutores Nelson Adami Andreollo, Luiz Roberto Lopes, Luiz Sérgio Leonardi, Ilka de Fátima Santana Ferreira Boin, Elintom Adami Chaim, José Carlos Pareja, Francisco Callejas Neto e aos demais docentes e colegas do Departamento de Cirurgia pelos ensinamentos e incentivo.

Ao Departamento de Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

À Professora Doutora Luciana Rodrigues Meireles e ao Departamento de Anatomia Patológica pelo auxílio na avaliação das biópsias.

Ao Professor Doutor Joaquim Murray Bustorff Silva, coordenador da subcomissão de pós-graduação em Cirurgia que muito contribuiu para o meu crescimento profissional e pessoal. Meus agradecimentos pelo incentivo à realização deste trabalho e pela orientação durante a minha formação.

Ao Laboratório de Biologia Molecular e Sinalização Celular, ao Professor Doutor Mário Saad e Professor Doutor Lício Augusto Velloso, obrigada pelo carinho com que fui acolhida depois de tanto tempo, pela confiança e pela receptividade.

Ao Sr. Luiz Joneri, obrigada pelo carinho, pela ajuda e disponibilidade.  
Ao Sr. Jósimo Pinheiro e ao Sr. Gerson Júlio Nery Ferraz.

Às funcionárias de enfermagem do Serviço de Colonoscopia do GASTROCENTRO pela ajuda e pelo carinho.

Aos funcionários do Centro Cirúrgico, enfermeiro Dirceu, enfermeira Regina, D. Lao e diversas outras pessoas que ajudaram na coleta das peças cirúrgicas e na conservação das mesmas.

À secretária Paula da Subcomissão de Pós Graduação, meus agradecimentos pela ajuda, pela disponibilidade e pelo incentivo que tornaram este trabalho um pouco mais fácil.

À bibliotecária Rita Ortega, do Hospital Sírio Libanês, minha sincera gratidão pela ajuda e prontidão com que respondeu às minhas solicitações; muito obrigada.

À Dra. Bianca Sodré pelo incentivo, pelo companheirismo e pela amizade .

Ao Dr. Sandro Nunes, amigo e grande incentivador.

Ao Dr. Guilherme Barreiro pela ajuda nas atividades de laboratório e pela companhia sempre bem vinda.

Agradeço aos colegas de trabalho, Dr. Alcindo Cortelazzi Jr., Dr. Aldo Serafim Araújo e aos demais colegas que mesmo com pouco tempo de convivência me confiaram à ajuda necessária para o término deste trabalho.

Aos pacientes que tornaram este trabalho possível.

Agradeço à minha família e especialmente aos meus pais pelo companheirismo, pela ajuda, pelo incentivo e pela presença.

Muito obrigada!

*“Tudo, aliás, é a ponta de um mistério,  
inclusive os fatos.*

*Ou a ausência deles.*

*Duvida?*

*Quando nada acontece há um milagre que não  
estamos vendo.”*

**Guimarães Rosa**

A doença de Crohn apresenta aspectos controversos e pouco compreendidos em relação a sua etiopatogenia e à sua evolução; o que torna difícil o manejo terapêutico desta doença. Nos últimos anos os avanços da biologia molecular têm possibilitado novas descobertas, no entanto, ainda existem muitas dúvidas em relação à sua etiopatogenia e à ação de diversos mediadores inflamatórios. **Objetivo:** Avaliar a expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-8 em fragmentos de íleo terminal de pacientes portadores de doença de Crohn em uso de mesalazina e azatioprina e compará-los aos indivíduos normais. **Casuística e Métodos:** Foram selecionados 25 pacientes acompanhados no Ambulatório de Doença Inflamatória Intestinal do HC-UNICAMP, portadores de doença de Crohn com acometimento de íleo terminal, e que foram, de acordo com protocolos vigentes, submetidos à colonoscopia de controle para avaliação da doença ou procedimento cirúrgico para ressecção ou plastia do segmento doente. Foi obtida amostra de íleo terminal para avaliação dos mediadores inflamatórios acima citados, por meio de técnica de imunoblot. Foram estudados sete pacientes que estavam em uso de mesalazina, nove que estavam em uso de azatioprina, sendo comparados com 9 controles que não portadores de doença inflamatória intestinal. Resultados: Não foi encontrada diferença na expressão do TNF- $\alpha$  entre os três grupos. Foi encontrada diferença estatisticamente significativa quando avaliadas as expressões da IL-1 $\beta$  e da IL-8. Os níveis de expressão de IL-8 e de IL-1 $\beta$  foram maiores no grupo que estava em uso de azatioprina quando comparados aos grupos Mesalazina e Controle ( $p < 0,05$ ). Conclusão: Os pacientes em uso de azatioprina apresentam maior expressão de IL-8 e IL-1 $\beta$  que aqueles em uso de mesalazina e que os controles. Isto poderia estar associado à ação da mesalazina que diminui, especificamente a ativação destas interleucinas.

Crohn's disease is an inflammatory bowel disease that is not currently understood. Much research is being carried out in order to comprehend its mechanisms of lesion and the inflammatory mediators involved in this disease. New advances in molecular biology have opened up new possibilities for further understanding this intricate pathology, yet, some doubts remain.

**Objective:** To evaluate the expressions of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-8 in terminal ileum biopsies from patients with Crohn's disease in treatment with mesalazine and azathioprine, and compare these expressions.

**Patients and Methods:** 25 patients from the Inflammatory Bowel Disease Ambulatory from the Clinic Hospital of the University of Campinas, who were submitted to colonoscopy or ileal resection and plastic surgery, were randomly selected. Biopsies from the terminal ileum were obtained and sent for immunoblotting analysis in order to determine the expressions of the proteins studied. Seven of the patients were taking mesalazine, while nine were on azathioprine and expressions were all compared to those of nine healthy controls.

**Results:** No statistical difference was found between the expressions of TNF- $\alpha$  amongst the three groups. In contrast, IL-1 $\beta$  and IL-8 were found in different levels of expression in the group taking azathioprine when compared to the mesalazine group and control ( $p < 0,05$ ).

**Conclusion:** Patients chronically taking azathioprine demonstrate higher levels of expression of the inflammatory mediators, IL-1 $\beta$  and IL-8, in terminal ileum biopsies, when compared to mesalazine treated and healthy counterparts. This effect could be due the inhibition of these proteins' expression induced by mesalazine, cooling down bowel's inflammatory activity back to normal.

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

APC	Célula apresentadora de antígeno
5-ASA	5 Aminossalicilato
AZA	Azatioprina
DC	Doença de Crohn
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Teste imunoenzimático
HBI	Índice de Harvey Bradshaw
IFN $\gamma$	Intérferon gama
IL-1 $\alpha$	Interleucina 1 alfa
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-18	Interleucina 18
LPS	Lipopolissacárides
Mesa	Mesalazina

NFkB	Fator nuclear de transcrição KappaB
PMSF	Fluoreto de fenilmetil sulfonila
TNF-R1	Receptor transmembrana do TNF 1
TNF-R2	Receptor transmembrana do TNF 2
RCUI	Retocolite ulcerativa inespecífica
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
T CD4	Linfócito T CD4
Th1	Linfócito T helper 1
Th2	Linfócito T helper 2
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TRIS	Tri(hidroximetil)-aminometano

## LISTA DE FIGURAS

---

	<b>PÁG.</b>
<b>Figura 1-</b> Etapas iniciais da ativação da resposta inflamatória.....	21
<b>Figura 2-</b> Mecanismo inicial da cascata inflamatória nos pacientes com doença de Crohn.....	21
<b>Figura 3-</b> Peça cirúrgica de pacientes em uso de mesalazina e que foram submetidos a cirurgia de ressecção.....	32
<b>Figura 4-</b> Fotos de colonoscopias de pacientes em uso de azatioprina.....	32
<b>Figura 5-</b> Aplicação das proteínas em gel de poliacrilamida.....	35
<b>Figura 6-</b> Eletroforese das proteínas utilizando fonte elétrica.....	36
<b>Figura 7-</b> Bandas protéicas auto radiografadas	36
<b>Figura 8-</b> Determinação da expressão do TNF- $\alpha$ nos grupos 1, 2 e Controle.....	40
<b>Figura 9-</b> Determinação da expressão da IL-1 $\beta$ nos grupos 1, 2 e Controle..	41
<b>Figura 10-</b> Determinação da expressão da IL-8 nos grupos 1, 2 e Controle....	42

	<b>PÁG.</b>
<b>RESUMO</b> .....	<i>viii</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>ix</i>
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>1.1- Considerações Gerais</b> .....	17
<b>1.2- Dados da Literatura</b> .....	17
1.2.1- Patogênese.....	18
1.2.1.1- Fatores ambientais.....	18
1.2.1.2- Tabagismo.....	18
1.2.1.3- Distúrbios emocionais.....	19
1.2.1.4- Agentes microbianos.....	19
1.2.2- Componentes genético.....	19
1.2.3- Participação do sistema imune.....	20
1.2.4- Tratamento clínico.....	24
a. Corticóides.....	24
b. Aminosalicilatos.....	24
c. Imunossupressores.....	25
d. Anti TNF- $\alpha$ .....	25
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	27
<b>3- CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	29
<b>3.1- Casuística</b> .....	30
3.1.1- População de referência.....	30

3.1.2- População de estudo.....	30
3.1.3- Critérios de exclusão.....	30
3.1.4- População de participante.....	30
<b>3.2- Metodologia.....</b>	<b>31</b>
3.2.1- Anticorpos, reagentes químicos e materiais.....	32
3.2.2- Soluções utilizadas.....	33
3.2.3- Extração de tecidos, imunoblot.....	34
3.2.4- Determinação de bandas.....	36
3.2.5- Apresentação de dados e análise estatística.....	37
3.2.6- Grau de atividade da doença.....	37
<b>3.3- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....</b>	<b>38</b>
<b>4- RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
4.1- Sexo e Idade.....	40
4.2- Índice de Harvey-Bradshaw.....	40
4.3- TNF- $\alpha$ .....	40
4.4- Expressão da Interleucina IL1- $\beta$ .....	41
4.5- Expressão da IL-8.....	41
<b>5- DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>6- CONCLUSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>49</b>
<b>8- ANEXOS.....</b>	<b>59</b>
Anexo 1- Grupo mesalazina.....	60
Anexo 2- Grupo azatioprina.....	61
Anexo 3- Grupo controle.....	62

<b>Anexo 4-</b> Tabela anátomo patológico.....	63
<b>Anexo 5-</b> Tabela Índice de Harvey Bradshaw.....	64
<b>Anexo 6-</b> Questionário de inclusão.....	65
<b>Anexo 7-</b> Termo de consentimento livre e esclarecido.....	66
<b>Anexo 8-</b> Parecer de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa.....	67

# **1- INTRODUÇÃO**



## **1.1- Considerações gerais**

A doença de Crohn (DC) foi descrita pela primeira vez em 1932, (CROHN et al., 1932) mas ainda apresenta vários aspectos pouco conhecidos como, por exemplo, os fatores etiológicos desencadeantes do processo inflamatório crônico ou os mecanismos responsáveis por um tipo de evolução com maior ou menor agressividade (FERGUSSON,1994; ARDIZZONE et al., 1999). Por muito tempo, o tratamento foi limitado ao uso de corticoesteróides, sulfassalazina e ácido 5-aminossalicílico, medicamentos utilizados em outras doenças e que tiveram seu uso adaptado às doenças inflamatórias intestinais de forma empírica (FIOCCHI,1998; SANDS, 2000). Nos últimos anos, os avanços da biologia molecular e da genética têm contribuído muito para o entendimento da sua patogenia, assim como dos distúrbios imunológicos envolvidos nos mecanismos de lesão tecidual. Biópsias dos locais afetados mostraram presença de grande quantidade de linfócitos e infiltrado neutrofílico, marcadores de processo inflamatório em atividade. (BRADESI et al., 2003; O’SULLIVAN et al., 2000). Além disso, é cada vez mais evidente a participação de citocinas modulando o processo inflamatório, e este conhecimento tem o potencial de desvendar aspectos relacionados ao mecanismo de ação dos medicamentos, tornando seu uso mais racional e principalmente, o desenvolvimento de drogas específicas para a DC (TARGAN et al, 1997). Desta forma, tem sido cada vez mais freqüente o uso de imunossupressores e da terapia biológica no tratamento da DC na prática clínica (ARDIZZONE e PORRO, 2002; BEHM e BICKSTON, 2006; HANAUER et al., 2006; SANDBORN et al., 2005).

## **1.2- Dados da literatura**

A incidência e a prevalência da DC variam de acordo com a localização geográfica. A prevalência varia de 10 a 100 casos por 100.000 habitantes e a incidência varia de 0,08 a 7 por 100.000 habitantes. A incidência é mais alta em países como Estados Unidos, Inglaterra, Escandinávia e Itália; intermediária em países do sul da Europa, África do Sul, Austrália e Nova Zelândia e baixa em países da Ásia e América do Sul (BINDER et al.,1982; KURATA et al., 1992).

No Brasil ainda não existem números confiáveis da incidência real, mas acredita-se que ela seja maior nas regiões Sul e Sudeste (DAMIÃO et al., 2006).

Nos últimos anos tem sido observado um aumento na incidência da doença de Crohn, relacionada tanto ao melhor reconhecimento da mesma como também a uma elevação real da incidência sugerindo a influência de fatores ambientais ainda não identificados (KEIGHLEY et al, 1998).

A DC pode acometer indivíduos em qualquer faixa etária mas tem maior incidência dos 20 aos 40 anos não havendo variação entre os sexos (MUNKHOLM et al., 1992).

### 1.2.1- Patogênese

Diversos são os fatores potencialmente envolvidos no desenvolvimento da DC. Atualmente, o conceito mais aceito é que o desenvolvimento do processo inflamatório crônico seja desencadeado por um antígeno infeccioso ou dietético, em indivíduo com predisposição genética, modulado por fatores ambientais, psicossomáticos ou relacionados à flora bacteriana intestinal (FERGUSSON, 1994).

#### 1.2.1.1- Fatores ambientais

Estes fatores são de certa forma os mais difíceis de serem avaliados e quantificados na evolução da DC. Acredita-se que exista influência do aleitamento materno, contato com agentes microbianos, tabagismo, uso de medicações, fatores dietéticos e estado emocional (KOUTROBAKIS et al., 1996).

#### 1.2.1.2- Tabagismo

Na DC o consumo de cigarro tem efeito prejudicial causando piora do processo inflamatório e crises de atividade da doença com maior frequência. O mecanismo através do qual a nicotina ativa o processo inflamatório vem sendo elucidado in vitro

(FIOCCHI, 1998). O efeito da nicotina está associado a um efeito inibitório da resposta Th2 (SOMMEVILLE, et al., 1984).

#### 1.2.1.3- Distúrbios emocionais

Alterações psicológicas como depressão, transtornos de ansiedade e o stress também estão envolvidos na patogênese da DC. O stress tem demonstrado ser um fator de desencadeamento e exacerbação da doença, principalmente o stress ocorrido por períodos prolongados (MAWDSLEY e RAMPTON, 2005; LEVENSTEIN et al., 2000).

#### 1.2.1.4- Agentes microbianos

Ainda não foram identificados agentes microbianos que estejam diretamente relacionados com o desenvolvimento da DC. A infecção microbiana tem sido considerada um componente importante em seu desenvolvimento, seja a presença de microorganismos invasores ou mesmo a presença de bactérias que são componentes da flora intestinal e que podem por algum motivo desencadear a ativação do sistema imune e o início da doença (ARDIZZONE e PORRO, 2002). O aumento da permeabilidade intestinal parece ter influência na patogênese da DC. Mesmo antes de desenvolver um grau importante de inflamação, no início da doença, estes pacientes já possuem alteração da permeabilidade intestinal, favorecendo o contato com antígenos luminais; o que parece ser um fator predisponente para o desenvolvimento da doença (HOLLANDER et al., 1986). Com o aumento do processo inflamatório, ocorre um maior comprometimento da barreira intestinal, possibilitando o aumento da estimulação antigênica em indivíduos predispostos e a ativação exacerbada do sistema imunológico, manifestada principalmente pela ativação de linfócitos B (FIOCCHI, 1998).

#### 1.2.2- Componente genético

A importância de aspectos genéticos na predisposição e acometimento pela DC, torna-se evidente em função da maior incidência desta doença em judeus (MAYBERRY et al., 1986), assim como entre pessoas da mesma família se comparados

com a população em geral (WETERMAN e PENA, 1984). Mais recentemente com os avanços nos estudos do genoma humano identificou-se o alelo NOD2/CARD15 (HUGOT et al., 2001; OGURA et al., 2001; HAMPE et al., 2001) característico da ocorrência da doença principalmente com acometimento do íleo terminal (ABREU et al., 2002 b). Esta mutação tem sido associada ao aumento da ativação do NF- $\kappa$ B pelos lipopolissacarídeos bacterianos. Vários estudos estão em andamento para esclarecer as alterações genéticas envolvidas, atualmente são conhecidas alterações cromossômicas associadas à DC que poderiam caracterizar fenótipos distintos (DENISE et al., 2003; CHO, 2004; BUHNER et al., 2006).

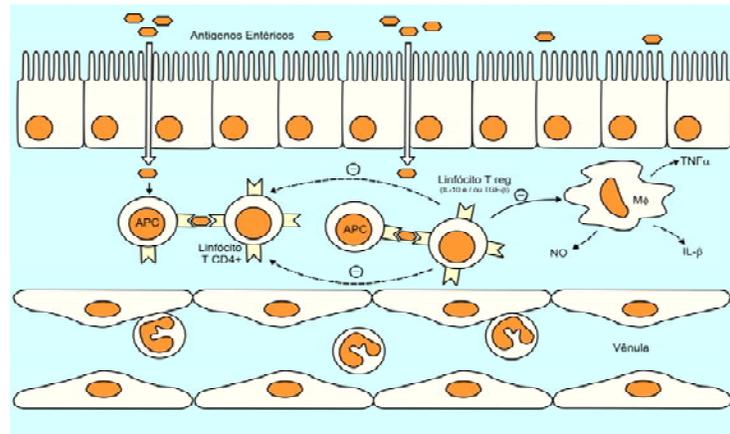
### 1.2.3- Participação do sistema imune

No intestino, a primeira barreira de proteção é constituída pelas células epiteliais que formam uma defesa relativamente impermeável que não permite a passagem de lipopolissacárides (LPS) nem bactérias, a menos que as mesmas sejam patogênicas e invasivas. A barreira epitelial apresenta poucos receptores para LPS, sendo pouco responsivas aos mesmos. Desta forma ocorre um controle da ativação da sinalização pró-inflamatória. Como na doença inflamatória ocorre destruição deste epitélio de revestimento; os antígenos têm maior acesso ao “sistema imune mucoso” na lâmina própria promovendo sua ativação (ABREU et al., 2002 a).

As células apresentadoras de antígeno ativarão células T CD4 que iniciarão a resposta inflamatória. A via inflamatória desencadeada depende do tipo de célula T ativada e das citocinas liberadas neste processo de ativação. As células apresentadoras de antígeno também desempenham papel importante uma vez que liberam citocinas que atuam modulando o processo inflamatório. As células Th1 e Th2 são responsáveis pela ativação da resposta imune celular (FIOCCHI, 1998).

A IL-12 (derivada de macrófago) e a IL-18 (derivada de epitélio e de macrófago) desviam a ativação da resposta imune para ativação das células Th1 que estão presentes nos pacientes com doença de Crohn. As citocinas Th1, são responsáveis pela liberação de TNF- $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-2 e IL-12. As células Th2 liberam IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, e

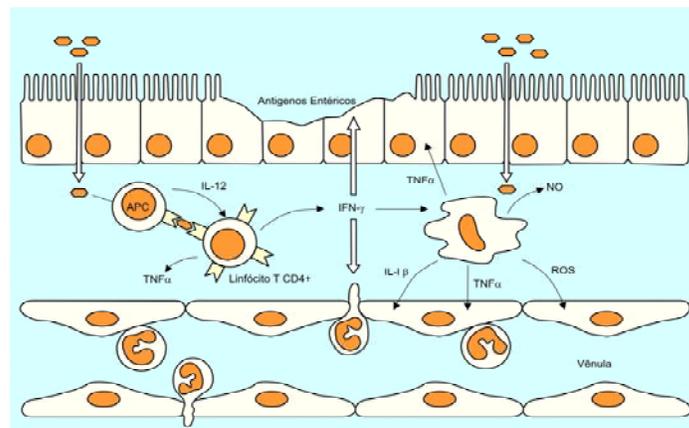
IL-13. Os dois tipos de resposta têm regulação recíproca de forma que as citocinas de um tipo de resposta atuam modulando o outro tipo. Como exemplo o  $IFN\gamma$  (Th1) atua suprimindo a resposta Th2; enquanto a IL-4, IL-10, IL-13 atuam inibindo a resposta Th1 (FIOCCHI, 1998; ELSON, 2000).



**Figura 1-** Controle do processo inflamatório na lâmina própria de indivíduos normais.

Alguns antígenos conseguem atravessar o epitélio e se ligam a células APC causando a ativação de linfócitos e a liberação de  $IFN-\gamma$ , IL-12, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  que suprimem a resposta Th2.

----- inibição  
 → ativação



**Figura 2-** Ativação do sistema imune no intestino.

----- inibição  
 → ativação

Atualmente sabe-se que o principal mecanismo envolvido na DC é uma hiper-ativação da resposta Th1 causando liberação de vários mediadores envolvidos na destruição celular. Existem dois mecanismos de controle da resposta inflamatória das células T na mucosa. Um primeiro baseado no equilíbrio entre células T efetoras e reguladoras de forma que as células T reguladoras podem atuar inibindo a ação das células T efetoras, através da produção de IL-10 e TGF- $\beta$  (POWRIE, 1995). E um segundo mecanismo, através do qual as células T ativadas sofrem apoptose (BOIRIVANT et al., 1999; INA et al., 1999). Na DC, as células T parecem estar resistentes à apoptose devido ao aumento da concentração de IL-6. As IL-6 formam um complexo com seu receptor solúvel e estimulam a cascata de genes que impedem a apoptose (ATREYA et al., 2000).

Vários trabalhos têm demonstrado que a expressão das citocinas pró inflamatórias está aumentada na lâmina própria de pacientes com doença inflamatória intestinal. O TNF- $\alpha$  parece ser um mediador central na ativação da cascata inflamatória na doença de Crohn (SHANAHAM, 2001; PLAYFORD e GHOSH, 2005). As interleucinas IL-1 $\beta$  e o fator nuclear NF- $\kappa$  $\beta$  também estão aumentados nestes doentes (MAHIDA et al., 1989; LIGUMSKY et al., 1990). O aumento das citocinas pró-inflamatórias na mucosa intestinal é um fator importante na patogênese desta doença; no entanto, o fator que desencadeia o aumento destas citocinas permanece desconhecido. Acredita-se que fatores de transcrição possam ser responsáveis pela hiper ativação da transcrição de genes pró inflamatórios. Desta forma o NF- $\kappa$  $\beta$  pode ser um dos fatores de ativação da transcrição envolvido neste mecanismo (LENARDO e BALTIMORE, 1989; BALDWIN, 1996).

Ação das citocinas estudadas:

1. TNF  $\alpha$ : é ativado no início da cascata inflamatória . Atua promovendo a liberação de citocinas das células epiteliais, auxiliando na lesão da barreira epitelial e iniciando a apoptose. O TNF é capaz de induzir a expressão de citocinas e de quimiocinas assim como estimular a produção de substâncias de adesão tecidual. Exerce sua ação através da sua ligação a 2 receptores: TNFR1 e TNFR2 que estão expressos em grande quantidade de células (BAZZONI e BEUTLER 1996).

Apesar das medicações com anticorpos anti -TNF terem se mostrado benéficas tanto nas pesquisas com animais quanto no uso em humanos (BRAEGGER et al., 1992); ainda é controverso se os níveis de expressão do TNF- $\alpha$  estão elevados no plasma ou mesmo nas áreas de lesão tecidual dos pacientes com Crohn (DIONNE et al., 1997).

2. IL-1 $\beta$ : A IL-1 é produzida nas formas de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , que se ligam ao mesmo receptor na superfície das células e exercem funções semelhantes. (DINARRELLO, 1991). Nos pacientes com doença inflamatória intestinal a expressão de IL-1 está aumentada principalmente na lâmina própria das células mononucleares (YOUNGMAN et al., 1993). A IL-1 amplifica a resposta inflamatória através da produção de vários agentes pró-inflamatórios e citocinas imunorreguladoras e estimula a produção de fibroblastos, células da musculatura lisa e a síntese de colágeno (DINARELLO e WOLFF, 1993).

O equilíbrio entre a IL-1 e seu antagonista (IL-1 receptor antagonist) pode ser um dos mecanismos envolvidos na doença. Este inibidor tem a capacidade de estabelecer a homeostase diminuindo a inflamação (AREND, 1993).

3. IL-8: atua na atração de neutrófilos e na ativação de células polimorfonucleares. In vitro, a IL-8 é secretada pelas células apicais do epitélio intestinal em resposta a estimulação antigênica, assim como o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  (DAIG et al., 1996; GRIMM et al., 1996).

O aumento das citocinas pró inflamatórias também pode decorrer da produção de fatores da quimioataxia pela mucosa (leucotrieno B4 e IL8) ou da migração destes fatores provenientes do lúmen (peptídeos derivados de bactérias). Acreditava-se que esses fatores fossem provenientes de células inflamatórias, no entanto alguns estudos demonstraram que células epiteliais normais isoladas em cultura são capazes de produzir IL-8. A secreção de IL-8 (citocina quimiotática) parece existir naturalmente, mas aumenta quando as células entram em contato com citocinas derivadas de macrófagos como o TNF- $\alpha$  ou IL-1 $\beta$ . Também foi demonstrado que células de mucosa aparentemente normal de DC ou RCUI secretam maior quantidade de IL-8 que células de pacientes sem doença inflamatória sugerindo que a IL-8 é uma citocina que é liberada no início do processo inflamatório (GRIMM et al., 1996).

Os níveis de RNAm de IL-8 estão aumentados na mucosa de pacientes com doença inflamatória intestinal. O aumento da IL-8 na mucosa inflamada se correlaciona diretamente com o grau de atividade da inflamação, com a quantidade de neutrófilos presentes e com os níveis teciduais de TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$  (MAZZUCCHELI et al., 1994).

#### 1.2.4- Tratamento clínico

O tratamento clínico da DC tem por objetivo diminuir ou suprimir o processo inflamatório, evitando a lesão tecidual e promover sua regeneração. A escolha do tratamento depende da localização e da gravidade da inflamação, bem como da presença de manifestações extra-intestinais, sendo que as drogas mais utilizadas são os corticóides, salicilatos, azatioprina, 6-mercaptopurina e os medicamentos biológicos.

a) Corticóide: Constitui importante medicação anti-inflamatória e permanece como medicação de escolha nas crises de exacerbação. Seus efeitos não se restringem ao trato gastrointestinal havendo conseqüências importantes do seu uso à nível sistêmico. Diminui a produção das citocinas pró-inflamatórias; IL-1, IL-6, IL-8 e a resposta Th1 causando diminuição de IL-2, IFN- $\gamma$ . Interfere também na resposta Th2 causando diminuição de IL-4 e IL-5 (ANGELI et al.,1999), assim como na translocação para o núcleo do NF-k $\beta$  (BARNES, 1997). Os corticoesteróides interferem diretamente na função leucocitária, inibindo a quimiotaxia, a fagocitose e interferindo no metabolismo do ácido aracônico e na produção de prostaglandinas (BERNSTEIN et al., 1997). Podem ser utilizados por via oral, endovenoso ou com ação tópica na forma de enemas. Quando a medicação é utilizada por via oral ou endovenosa os efeitos sistêmicos são mais intensos o que dificulta o uso da droga por períodos mais longos.

b) Aminossalicilatos: Os aminossalicilatos atuam no metabolismo do ácido aracônico inibindo a ciclooxigenase e as vias da 5-lipoxigenase. Estes agentes também alteram a resposta imune diminuindo a produção de anticorpos e a função linfocitária (GRISHAM, 1994). São utilizados na forma de comprimidos de sulfassalazina ou de mesalazina na tentativa de manter a doença em remissão. A mesalazina (5-ASA) tem ação

diferente da do ácido salicílico; altas concentrações de aminosalicilatos inibem a produção de prostaglandinas e prostaciclina (LIGUMSKY et al., 1981; SHARON et al., 1978), enquanto quantidades mais baixas estimulam a produção de prostaglandinas e prostaciclina. Os derivados 5-ASA possuem efeitos anti-inflamatórios múltiplos; inibem a produção de IL-1 e TNF- $\alpha$ . Além disso, a sulfassalazina inibe a ligação do TNF- $\alpha$  no seu receptor reduzindo a sinalização da resposta inflamatória. O 5-ASA é também um anti-oxidante e captador de radicais livres, algumas de suas ações anti-inflamatórias ocorrem através da inibição da transcrição do NF-kB (THIELE et al., 1999; SCHEIBER et al., 1998; ROGLER, et al., 1998).

c) Imunossupressores: Entre os imunossupressores, o mais utilizado no tratamento da DC é a azatioprina (AZA) e seu metabólito ativo 6-mercaptopurina, utilizados em pacientes que possuem doença de difícil controle e que são resistentes ou dependentes do uso crônico de corticosteróides. O mecanismo exato da ação da azatioprina ainda não é conhecido; no entanto sabe-se que a 6-tioguanina é a substância responsável pelas ações desta droga. O acúmulo intracelular dos nucleotídeos de 6-tioguanina causam inibição das vias de metabolização das purinas e da síntese e reparo de DNA inibindo a divisão celular e a proliferação (LENNARD, 1992). O acúmulo de um metabólito intermediário causa inibição do reconhecimento antigênico dos linfócitos, inibindo a reação leucocitária e a toxicidade das células Natural-killer (NK) (SZAWLOWSKI, et al., 1985; ELION, 1977; CAMPBELL et al., 1976). Ocorre também diminuição das células plasmáticas na lâmina própria e na contagem periférica de leucócitos; a azatioprina possui atividade anti-inflamatória inibindo a célula T citotóxica e a célula NK.

d) Anti TNF- $\alpha$ : O infliximabe foi o primeiro anticorpo monoclonal IgG1 anti TNF-  $\alpha$  que tem sido utilizado com maior frequência em casos de DC com resultados clínicos e endoscópicos muito favoráveis (HANAUER et al., 2002). O infliximabe se liga ao TNF livre e ao TNF transmembrana impedindo a ligação do TNF ao seu receptor. O TNF é uma citocina central tanto na via inflamatória quanto na via de proliferação celular. Monócitos e macrófagos são as principais fontes de liberação de TNF enquanto os linfócitos T e os monócitos expressam TNF transmembrana. A ação do TNF ocorre através

da ligação do TNF livre aos seus receptores transmembrana. Os receptores ativados desencadeiam a ativação do NF- $\kappa$ B no citoplasma gerando a transcrição de vários genes pró-inflamatórios (BEGG e BALTIMORE, 1986). O infliximabe se liga com alta afinidade aos receptores de TNF livres e transmembrana neutralizando seus efeitos. O TNF, incapaz de se ligar ao seu receptor, permanece livre em maiores concentrações no plasma, o que diminui a resposta Th1, a produção de citocinas e de fosfolipase A2. Além disso, o infliximabe parece se ligar aos receptores em monócitos causando ativação das caspases 8, 9 e 3 promovendo a apoptose (LUGERING, et al., 2001).

Considerando estes dados em relação ao tratamento clínico e sabendo que a mesalazina e a azatioprina são medicações que embora muito utilizadas na prática clínica não existem trabalhos correlacionando o seu uso e o efeito sobre as citocinas em pacientes; objetivamos realizar um trabalho no qual realizássemos a dosagem das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-8 em pacientes com DC em uso destas medicações.

## **2- OBJETIVOS**



1. Avaliar as expressões das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-8 em fragmentos de íleo terminal de pacientes com diagnóstico de doença de Crohn.

2. Comparar níveis teciduais destas citocinas em indivíduos controle e pacientes tratados com mesalazina ou azatioprina.

### **3- CASUÍSTICA E MÉTODOS**



### **3.1- Casuística**

#### 3.1.1- População de referência

Participou deste estudo a população de pacientes atendida no Ambulatório de Doença Inflamatória Intestinal “Dr. Ricardo Góes” – GASTROCENTRO - UNICAMP, portadores de doença inflamatória intestinal no período compreendido entre fevereiro de 2005 e março de 2007.

#### 3.1.2- População de estudo

Pacientes portadores de DC com acometimento ileal.

#### 3.1.3- Critérios de exclusão:

Foram excluídos os doentes que estavam em uso de outras medicações que poderiam interferir sobre os mediadores inflamatórios estudados, como por exemplo a prednisona, infliximabe ou adalimumabe.

#### 3.1.4- População de participantes

Participaram deste estudo, 16 pacientes portadores de doença de Crohn com acometimento ileal, sendo sete em uso de mesalazina (Grupo 1) e nove em uso de azatioprina (Grupo 2) e o grupo controle constituído por nove indivíduos, submetidos a colonoscopia no Gastrocentro – UNICAMP ou a tratamento cirúrgico (fechamento de ileostomia) por outros motivos que não a doença inflamatória intestinal.

Os pacientes do Grupo 1, apresentavam média de idade de 42,42 (28 - 75)anos, com predomínio do sexo feminino (71%).

Os pacientes do Grupo 2, apresentavam média de idade de 38,22 (25 - 48) anos, 66,6% corresponderam ao sexo masculino.

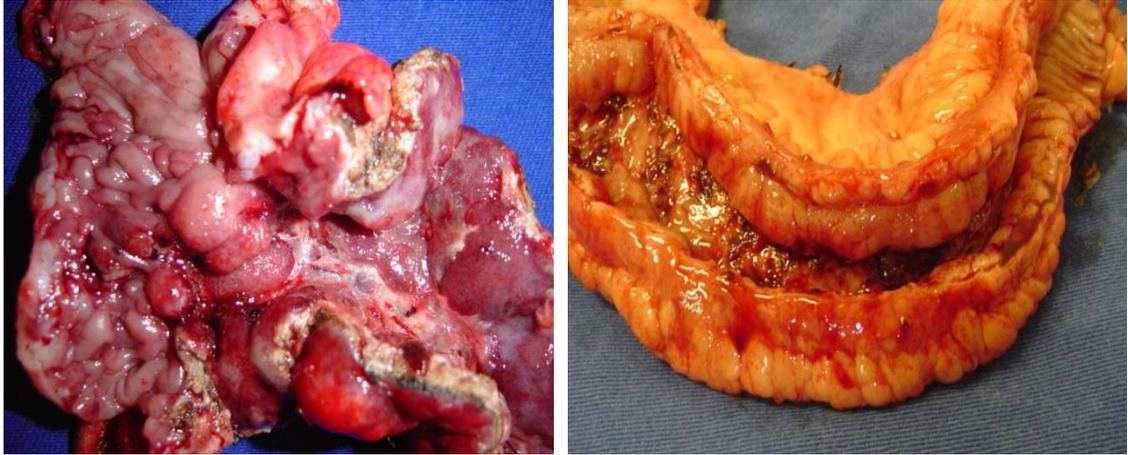
No grupo controle, 56% eram do sexo masculino, com média de idade de 57,8 (42 - 76) anos.

No Grupo 1, todos os fragmentos de íleo foram obtidos de espécimes cirúrgicos. Nos grupos 2 e controle, os fragmentos foram obtidos a partir de peças operatórias em três casos, e de biópsias endoscópicas em outros seis de cada grupo.

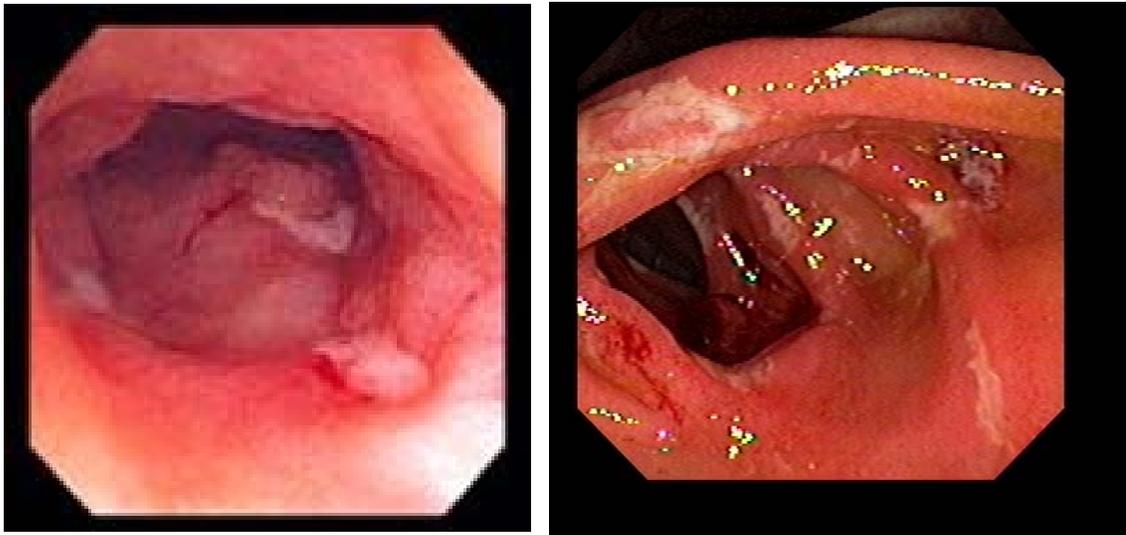
### **3.2- Metodologia**

Foram selecionados dois Grupos de pacientes; um primeiro grupo de sete pacientes com forma de doença mais atenuada e que permaneciam em tratamento exclusivo com mesalazina, denominado Grupo 1 (Anexo 1); e um segundo grupo, de nove doentes, que são portadores de uma forma de doença um pouco mais agressiva e que permaneciam em uso de azatioprina, Grupo 2 (Anexo 2). Como Grupo Controle foram utilizados pacientes não portadores de doença inflamatória e que foram submetidos a colonoscopia com biópsia ou cirurgia por outra razão (Anexo 3).

Os pacientes foram submetidos a colonoscopia no Serviço de Colonoscopia (GASTROCENTRO – UNICAMP) para avaliação do grau de atividade da doença. Foi seguida a rotina deste Serviço, sendo realizado preparo de cólon com *Bisacodil* e *Manitol* na véspera do exame e para a realização do procedimento foram submetidos à sedação com *Midazolam*. Durante o exame foram coletados 04 fragmentos de íleo terminal utilizados para avaliar a expressão das citocinas e 02 fragmentos que foram enviados para estudo anátomo patológico para avaliar o grau de atividade da doença (Anexo 4). Foram utilizados videocolonoscópios das marcas Fujinon® e Olympus®. Os pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico no Hospital das Clínicas da UNICAMP, seja por estenose ou fístula, tiveram também 6 fragmentos de mucosa da peça cirúrgica coletados para inclusão neste trabalho.



**Figura 3-** Peça cirúrgica de pacientes em uso de mesalazina submetidos a cirurgia de ressecção.



**Figura 4-** Fotos de colonoscopias de pacientes em uso de azatioprina.

### 3.2.1- Anticorpos, reagentes químicos e materiais

Os reagentes e aparelhos para realização de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foram adquiridos da Bio-Rad (Richmond, CA). Metano hidroximetilamina (TRIS), fenil-metilsulfonilfluoreto (PSMF), aprotinina e ditiotretol (DTT), Triton X-100, Tween 20, e glicerol foram fornecidos pela

Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA). A membrana de nitrocelulose (BA85, 0.2 $\mu$ m) e a proteína A Sepharose 6 MB foram obtidas da Amersham (Aylesbury, UK). Os anticorpos anti-IL-1 $\beta$  (sc-1252, goat polyclonal), anti-IL-8 (sc-7922, goat polyclonal), anti-TNF- $\alpha$  (sc-1347, goat polyclonal), foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology (CA, USA). O marcador de peso molecular foi o PageRuler<sup>TM</sup> da Fermentas (MD, USA). Os reagentes para a reação de quimioluminescência foram da SuperSignal<sup>®</sup> (Rockford).

### 3.2.2- Soluções utilizadas

- Tampão de extração A: utilizado para a extração das proteínas celulares dos tecidos estudados, contém: Trisma base pH 7,5 (hidroximetil amino metano) 100mM, SDS (dodecil sulfato de sódio) 10%, EDTA (Ácido etileno-diamino tetracético) 10mM, fluoreto de sódio 100mM, pirofosfato de sódio 10mM, ortovanadato de sódio 10mM. O ortovanadato foi colocado no momento de utilização do tampão.
- Solução tampão de extração B, para imunoprecipitação: utilizada para a extração de proteínas celulares dos tecidos estudados, que são posteriormente imunoprecipitadas. Contém: Trisma base 100mM, EDTA 10mM, pirofosfato de sódio 10 mM, fluoreto de sódio 100mM, ortovanadato de sódio 10mM, PMSF 2 mM (diluído em álcool etílico), Triton X-100 1% e 0,1mg/ml de aprotinina. A solução foi mantida a 4°C, sendo que o ortovanadato, o PMSF e a aprotinina foram acrescidos no momento do uso.
- Tampão de Laemmli (5X): usado para estocar o material extraído e sua posterior aplicação no gel de poliacrilamida para eletroforese (SDS-PAGE), contém: azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 10%.
- Solução tampão utilizada na eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE): contém: Trisma base 200mM, glicina 1,52M, EDTA 7,18mM e SDS 0,4%. Para uso, a solução é diluída 1:4.

- Solução tampão para transferência: empregada para a transferência das proteínas separadas no SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose, contém: Trisma base 25mM, glicina 192 mM, Metanol 20% e SDS 0,02% para facilitar a diluição de proteínas de alto peso molecular. Mantida estocada a 4°C.
- Solução tampão para SDS-PAGE – Gel de resolução (resolving): tampão composto de EDTA 4mM, SDS 2%, Trisma base 750 mM, com pH ajustado para 8,9 com ácido clorídrico.
- Solução tampão para SDS-PAGE – Gel da fase de empilhamento (stacking) das proteínas: contém: EDTA 4 mM, SDS 2%, Trisma base 50mM, com pH ajustado para 6,7 com ácido fosfórico.
- Solução basal: solução básica utilizada para o manuseio da membrana de nitrocelulose após transferência das proteínas, contém: Cloreto de sódio 150 mM, Trisma base 10 mM, Tween 20 0,02%.
- Solução bloqueadora: albumina 5% e azida sódica 0,02%, dissolvidos em solução basal para as citocinas IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$ .
- Solução para anticorpos: solução contendo anticorpos específicos que identificam as proteínas transferidas para a membrana de nitrocelulose. Contém 3% de leite em pó desnatado e azida sódica 0,02%, diluídos em solução basal.

A albumina 5% utilizada foi de origem bovina.

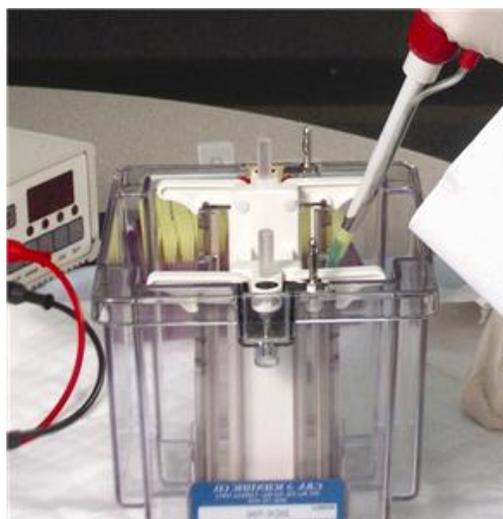
### 3.2.3- Extração de tecidos e imunoblot

Fragmentos obtidos a partir de biópsias endoscópicas ou biópsias de peças cirúrgicas de pacientes com doença de Crohn foram congelados em nitrogênio líquido, e armazenados a -80°C, no Laboratório de Sinalização Celular - FCM UNICAMP, para

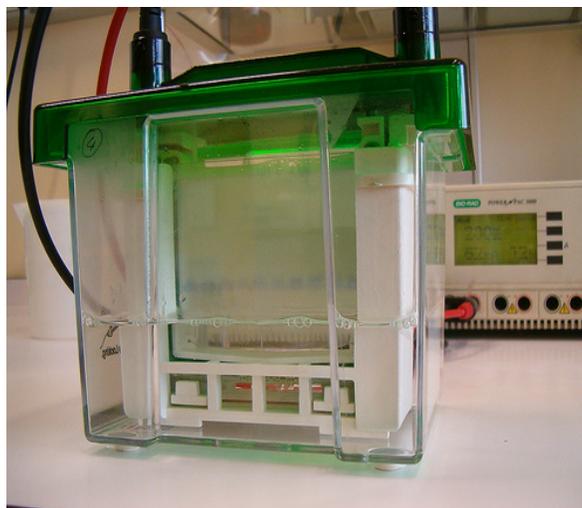
posterior homogeneização em tampão de imunoprecipitado contendo 1% de Triton X 100, 100mM de Tris (pH 7,4), 100mM de pirofosfato de sódio, 100mM de fluoreto de sódio, 10mM de EDTA, 10mM de vanadato de sódio, 2mM de PMSF e 0,1mg/ml de aprotinina a 4°C, com Polytron PTA 20S em velocidade máxima por 30 segundos (modelo PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY).

O homogeneizado foi então centrifugado a 11.000 rpm por 20 minutos a 4°C.

No sobrenadante foi determinada a concentração de proteína utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976) e posteriormente preparou-se amostra contendo 125µg de proteína total para ser utilizado nos experimentos de imunoblot e separação por SDS-PAGE. As amostras foram diluídas em tampão de Laemmli, contendo 100mmol/L de DTT. Após rápida fervura, foram aplicadas em gel de poliacrilamida para separação por eletroforese (SDS-PAGE). As proteínas separadas em SDS-PAGE foram transferidas para membranas de nitrocelulose, em aparelho de transferência da BIO-RAD. As membranas de nitrocelulose foram incubadas “overnight” com 10µl de anticorpo específico (anti-IL-1β, anti-IL-8 ou anti-TNF- α) . A ligação do anticorpo a proteínas não-específicas foi minimizada pela pré-incubação da membrana de nitrocelulose com tampão de bloqueio (albumina 5%) por 90 minutos (VELLOSO et al., 1996; ARAÚJO et al., 2005).



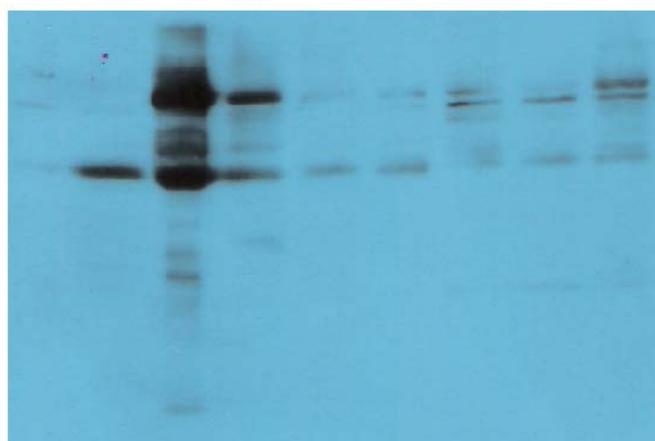
**Figura 5-** Aplicação das proteínas em gel de poliacrilamida



**Figura 6-** Eletroforese das proteínas utilizando fonte elétrica

#### 3.2.4- Determinação das bandas

Após incubação com anticorpo primário específico, foi realizada incubação com anticorpo secundário, que possui em sua porção Fc uma peroxidase, que é uma enzima que se ligará ao reagente da reação de quimioluminescência que contém luminol, produzindo luz, que será captada através de auto-radiografia. O sinal foi detectado por meio de reação de quimioluminescência (SuperSignal®West Pico Chemiluminescent Substrate from Pierce Biothechnology, Inc. Rockford).



**Figura 7-** Bandas protéicas auto-radiografadas

### 3.2.5- Apresentação dos dados e análise estatística

Os resultados são apresentados em unidades arbitrárias, como comparações das bandas protéicas auto-radiografadas. Foi realizada a quantificação através de densitometria usando o programa “Gel Pro Analyzer 3.1” (Exon-Intron Inc, Farrell MD). Os resultados foram notificados como média, com variação do erro padrão. As médias foram calculadas à partir do Grupo Controle que foi considerado com o valor arbitrário de 100. Foi utilizada análise de variância (Anova), seguida por análise de significância (Teste de Tukey-Kramer). O nível de significância adotado foi  $p < 0,05$ .

### 3.2.6- Grau de atividade da doença

Para a classificação do grau de atividade da doença dos pacientes foi utilizado o índice de Harvey-Bradshaw (HBI), em que valores numéricos são atribuídos as seguintes variáveis: bem estar, dor abdominal, número de evacuações líquidas, a presença de tumoração abdominal e a presença de outras complicações. Foi considerado para esta avaliação o período pré-operatório imediato nos pacientes submetidos à cirurgia, empregando-se o mesmo por ocasião da endoscopia nos pacientes submetidos a este procedimento (Anexo 5).

Índice de Harvey-Bradshaw:

ÍTENS		Escores
1.	Bem estar	0= muito bem, 1= não muito bem, 2= mal, 3= muito mal
2.	Dor Abdominal	0= nenhuma, 1=moderada, 3= intensa
3.	Número de evacuações líquidas por dia	No. de evacuações líquidas / dia
4.	Tumoração abdominal	0= nenhuma, 1= duvidosa, 2= palpável, 3= palpável e tensa
5.	Complicações	Artralgia, uveíte, eritema nodoso, estomatite, fissura anal, fistula, abscesso

### **3.3- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa**

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp , registrado sob nº.526/2005 (Anexo 8). Todos os participantes assinaram o termo de consentimento informado (Anexo 7).

## **4- RESULTADOS**



#### 4.1- Sexo e idade

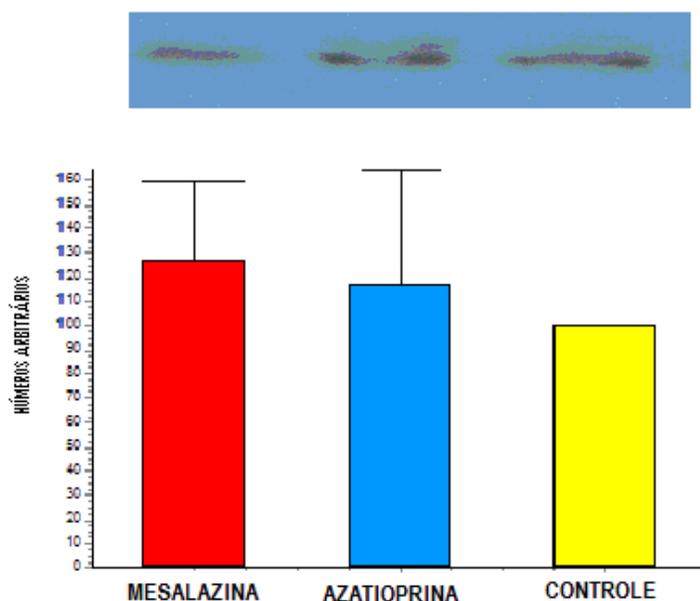
A análise da variável categórica sexo entre os grupos não demonstrou diferença estatisticamente significativa. Com relação à idade não se observou diferenças entre os Grupos 1 e 2 porém a idade no Grupo Controle foi maior em relação aos Grupos 1 e 2 ( $p < 0,05$  ANOVA).

#### 4.2- Índice de Harvey-Bradshaw

Quanto ao cálculo do Índice de Harvey Bradshaw (Anexo 5) os doentes do Grupo 1 apresentaram índice médio de 12,8 variando de 8 a 21, enquanto que no Grupo 2, o valor médio foi de 6,4 variando de 1 a 13 ( $p = 0,0147$ ).

#### 4.3- TNF- $\alpha$

Não houve diferença na expressão da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ , na mucosa ileal entre os Grupos 1 e 2 ( $p > 0,05$ ). De modo semelhante, a expressão de TNF- $\alpha$  no Grupo Controle não evidenciou diferença significativa quando comparada com os Grupos 1 e 2 (Figura 8).

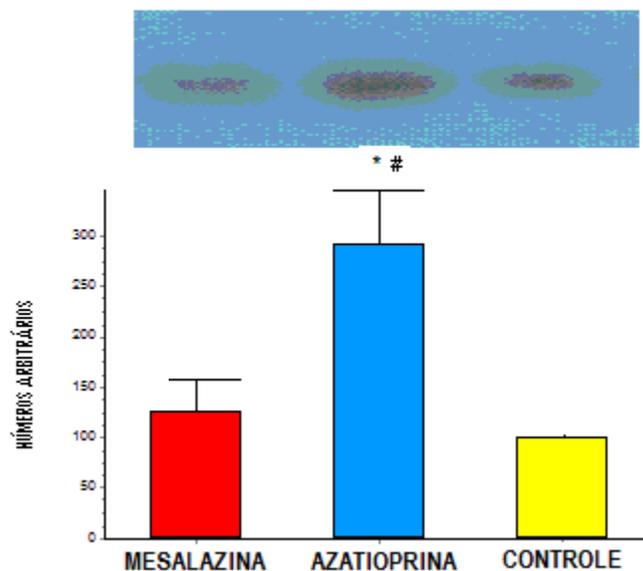


**Figura 8-** Determinação da expressão do TNF- $\alpha$  nos Grupos 1, 2 e Controle.

\* $p < 0,05$  vs mesalazina e # $p < 0,05$  vs controle

#### 4.4- Expressão da interleucina IL1- $\beta$

Os níveis de interleucina IL1- $\beta$  no Grupo 2 foram estatisticamente maiores de forma significativa em relação os Grupos 1 ( $p < 0,001$ ) e Controle ( $p < 0,001$ ), não havendo diferenças significativas entre esses últimos ( $p > 0,05$ ), (Figura 9).

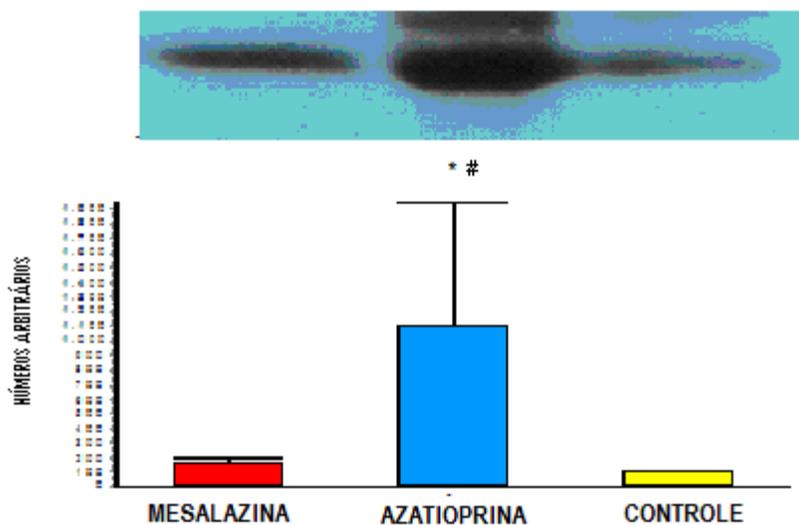


**Figura 9-** Determinação da expressão da IL-1 $\beta$  nos Grupos 1,2 e Controle.

\* $p < 0,05$  vs mesalazina e # $p < 0,05$  vs Controle

#### 4.5- Expressão da IL-8

A expressão da IL-8 no Grupo 2 foi estatisticamente maior de forma significativa em relação aos Grupos 1 ( $p < 0,05$ ) e Controle ( $p < 0,01$ ), não havendo diferenças significativas entre esses últimos ( $p > 0,05$ ), (Figura 10).



**Figura 10-** Determinação da expressão da IL-8 nos grupos 1,2 e Controle.

\* $p < 0,05$  vs mesalazina e # $p < 0,05$  vs Controle

## **5- DISCUSSÃO**



A persistência do processo inflamatório na DC está associado à expressão aumentada de citocinas inflamatórias, sem a contra-regulação de fatores anti-inflamatórios. O melhor conhecimento dos mecanismos inflamatórios torna-se importante para a compreensão adequada da complexa interação existente entre diferentes substâncias expressas por células do sistema imune. A dosagem destas substâncias a partir de amostras teciduais é relevante, pois permite avaliar o padrão da ativação de citocinas inflamatórias liberadas principalmente a partir células mononucleares da mucosa intestinal em diferentes condições, como por exemplo, o emprego de terapias distintas. Diferenças no padrão de ativação de citocinas inflamatórias poderiam se correlacionar com a resposta terapêutica ou ação de diferentes medicamentos (PAPADAKIS KA, TARGAN, 1997).

O tratamento clínico das doenças inflamatórias intestinais apresenta alterações nos últimos anos em função do conhecimento da história natural da doença (ELSON, 2000) e do desenvolvimento de medicamentos biológicos (SIEGEL et al., 1995; VAN DULLEMEN et al., 1995). Além disso, o emprego cada vez mais freqüente de imunossupressores como a azatioprina e 6-mercaptopurina, possibilita melhora clínica prolongada, além do fechamento de fístulas perineais (TRAVIS et al, 2006). Assim torna-se interessante avaliar a correlação entre a expressão de citocinas teciduais em função da terapêutica empregada.

Os aminosalicilatos, sendo a sulfassalazina e mesalazina as mais utilizadas e conhecidas em nosso meio, são efetivos no tratamento da RCUI e DC. Inibem a produção de TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$  (COMINELLI e DINARELLO,1992; RACHMILEWITZ et al 1992), além de ligarem-se ao receptor de TNF- $\alpha$  bloqueando sua ação (SANAHAN et al., 1990).

O mecanismo de ação da azatioprina e seu metabólito 6-mercaptopurina ocorre através da inibição de vias metabólicas das purinas e síntese de DNA (LENNARD, 1992) e apoptose de linfócitos (TIEDE et al., 2003), porém sua ação na expressão de citocinas na DC não é totalmente conhecido.

As interleucinas TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  e IL-8 e encontram-se aumentadas na mucosa ileal e colorretal em portadores de DC (MAHIDA et al., 1989, REINECKER et al 1993, DAIG et al., 1996).

TNF- $\alpha$  é considerada citocina polarizante, pois é liberada por células apresentadoras de antígenos, induzindo a diferenciação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em Th 1, exercendo várias ações como indução de expressão de citocinas, apoptose e lesão epitelial, além de produção de moléculas de adesão por células endoteliais (GUY et al., 1998; ABREU et al., 1995; YANG et al., 1997).

O papel do TNF- $\alpha$  no início do processo inflamatório e a resposta clínica ao emprego dos medicamentos com ação anti TNF- $\alpha$  constataram a importância da mesma na etiopatogenia da DC. Entretanto, estudos clínicos avaliando níveis séricos e teciduais de TNF- $\alpha$ , são controversos (BRAEGGER et al., 1992; NICHOLLS et al., 1993). Este aspecto contraditório poderia ser explicado pela presença de macrófagos em menor número na lamina própria, assim como da intensidade do processo inflamatório por ocasião daquela avaliação. Neste estudo, a expressão tecidual de TNF- $\alpha$  não evidenciou diferenças entre os grupos, achado este em conformidade com relatos da literatura (DIONNE et al., 1997).

IL1- $\beta$  é potente citocina pró-inflamatória exercendo importante papel na indução e amplificação da resposta inflamatória, sendo produzida por macrófagos, monócitos, fibroblastos e células endoteliais. Evidenciaram-se níveis mais elevados de IL1- $\beta$  em mucosa de cólon e íleo de portadores de DC em relação aos controles, considerando que a maior produção desta citocina ocorreria em função da ativação de macrófagos (DINARELO, 1996; MAHIDA et al., 1989). No estudo destes autores, todos os pacientes encontravam-se em uso de corticóides, e de forma interessante, este medicamento não diminuiu a expressão desta citocina. Resultados semelhantes foram obtidos por YOUNGMAN et al., 1993 e REINECKER et al., 1993, constatando níveis teciduais elevados de IL1- $\beta$ . Estes correlacionaram a expressão tecidual de IL1- $\beta$  com a lesão tecidual e consideraram que sua determinação pode ser um método útil para avaliar a intensidade da lesão tecidual. A mesalazina exerce sua ação em parte inibindo a IL1- $\beta$ , enquanto que o mecanismo em relação à secreção desta interleucina pela azatioprina não está bem elucidado. Na presente casuística, os dados obtidos corroboram este fato, pois os níveis teciduais de IL1- $\beta$  foram maiores no Grupo 2 em relação ao Grupo 1, não ocorrendo diferenças deste em relação ao controle. Porém este achado não esteve relacionado ao

melhor controle do processo inflamatório por este medicamento, evidenciado por valores mais elevados do índice de Harvey-Bradshaw e necessidade de tratamento cirúrgico.

A IL-8 induz a quimiotaxia de neutrófilos, sendo produzida por células epiteliais a partir de estímulo antigênico e ação de TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$  (ECKMAN et al., 1993). DAIG et al. (1996) constataram níveis teciduais de citocinas pró-inflamatórias mais elevados em portadores de DC em relação a RCUI e controles em fragmentos não inflamados, constatando a presença de processo inflamatório latente. Deve-se considerar também que a produção de citocinas inflamatórias em segmentos intestinais endoscopicamente normais de portadores de doença inflamatória intestinal tende a ser elevado em relação à mucosa normal (LEAL et al., 2006 e 2007), porém em níveis inferiores aos segmentos acometidos (REINECKER et al., 1993). Porém Mitsuyama et al (1994) comprovaram que a maior expressão de IL-8 esta relacionada com a intensidade do processo inflamatório na mucosa, assim como níveis teciduais mais elevados de TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$ . Neste estudo, a expressão de IL-8 foi maior no Grupo 2 em relação aos Grupos 1 e Controle, correlacionando-se com níveis mais altos de IL1- $\beta$  no Grupo 2. Este achado permitiria constatar a característica de que o emprego de azatioprina interferiu pouco na expressão de IL1- $\beta$  e IL-8.

Nesta casuística, os pacientes do Grupo 1 apresentaram valores mais altos do índice de Harvey-Bradshaw, pois se encontravam na véspera do procedimento cirúrgico. Porém este achado não se correlacionou com a expressão de TNF- $\alpha$ , IL1-  $\beta$  e IL-8. No Grupo 2, os valores altos de IL1- $\beta$  e IL-8 podem ser secundários ao fato da azatioprina pouco interferir na expressão destas citocinas, assim como, traduzir uma forma mais agressiva de DC. De fato, o uso de azatioprina tem sido preconizado para as apresentações mais graves e níveis tissulares altos de TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$  em períodos de remissão, identifica fator de risco para recidiva (SCHEIBER et al., 1999).

Os dados obtidos neste trabalho evidenciam que a expressão tissular de IL1- $\beta$  e IL-8 é inibida pela ação da mesalazina, porém estes pacientes encontravam-se em fase de maior atividade da doença, assim como de lesão tissular, sugerindo que outras vias inflamatórias mais importantes para a manutenção inflamatória permaneçam em atividade.

## **6- CONCLUSÃO**



Com base nos resultados obtidos, demonstrou-se que:

1. A expressão do TNF- $\alpha$  na mucosa ileal foi semelhante nos três grupos (1, 2 e Controle).
2. As expressões da IL1- $\beta$  e IL-8 foram maiores no Grupo 2 quando comparadas aos Grupos 1 e Controle.

## **7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



Abreu-Martin MT, Vidrich A, Lynch DH, Targan SR. Divergent induction of apoptosis and IL-8 secretion in HT-29 cells in response to TNF-alpha and ligation of Fas antigen. *J Immunol*. 1995;155:4147-4154.

Abreu MT, Arnold ET, Thomas LS. TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune-mediated signals in human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2002, 277: 20431-20437(a).

Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, Hang T, Gaiennie J, Landers C, Vasiliauskas E, Kan L, Rojany M, Papadakis K, Rotter J, Tangan S, Yang H. Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002, 123: 679-688(b).

Angeli A, Masera RG, Sartori ML, Fortunati N, Racca S, Dovio A, Staurengi A, Frairia R. Modulation by cytokines of glucocorticoid action. *Ann NY Acad Sci* 1999; 876: 210-220.,

Araújo EP, De Souza CT, Gasparetti AL, Ueno M, Boschero AC, Saad MJ, Velloso LA. Short-term in vivo inhibition of insulin receptor substrate-1 expression leads to insulin resistance, hyperinsulinemia, and increased adiposity. *Endocrinology* 2005;146:1428-1437.

Ardizzone S, Bollani S, Manzionna G, Bianchi PG. Inflammatory bowel disease approaching the third millenium, pathogenesis and therapeutic implications? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11: 27-32

Ardizzone S, Porro B. Inflammatory Bowel Disease: new insight into pathogenesis and treatment. *Journal of internal medicine* 2002: 252; 475-496.

Arend WP. Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv Immunol* 1993; 54: 167-277.

Atreya R, Mudter J, Finotto S, Mullberg J, Jostock T, Wirtz S. Blockade of interleukin 6 transsignalling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in Crohn's disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med* 2000; 6: 583-8.

Baldwin AS. The NF-KB and I-KB proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 649-681.).

- Barnes PJ. Nuclear factor-kappa  $\beta$ . *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29: 867-870.
- Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Méd* 1996; 334 : 1717-1725.
- Begg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 1986; 274: 782-784.
- Behm B, Bickston S. Medical management of Crohn's disease; current therapy and recent advances. *Expert Rev Clinical Immunology* 2006; 2,1: 109-120.
- Bernstein CN, Sargent M, Rawsthorne P, Rector E. Peripheral blood lymphocyte beta 2 integrin and ICAM expression in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 2238-2349.
- Binder V, Both H, Hansen PK, Hendriksen C, Kreiner S, Torp-Pedersen K. Incidence and prevalence of ulcerative colitis and Crohn's disease in the County of Copenhagen. *Gastroenterology* 1982; 83: 563-568.
- Boirivant M, Marini M, Di Felice G, Pronio AM, Montesani C, Terzigni R, Strober W. Lamina propria T cell in Crohn's disease and other gastrointestinal inflammation show defective CD2 pathway-induced apoptosis. *Gastroenterology* 1999; 116: 557-65.
- Braegger CP, Nicholls S, Murch SH, Stephens S, MacDonald TT. S et al. Tumor necrosis factor  $\alpha$  in stool as a marker of intestinal inflammation. *Lancet* 1992; 339:89-91.
- Bradesi S, McRoberts JA, Anton PA, Mayer EA. Inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome: separate or unified? *Curr Opin Gastroenterol* 2003; 19:336-42.
- Buhner S, Buning C, Genschel J, Kling K, Herrmann B, Dignass A, Kuechler I, Krueger S, Schmidt H, Lochs H. Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD 153020insC mutation? *Gut*, 2006; 55: 342-347.
- Campbell AC, Skinner JM, MacLennan IC, Hersey P, Waller CA, Wood J, Jewell DP, Truelove SC. Immunosuppression in the treatment of inflammatory bowel disease II. The effects of azathioprine on lymphoid cells populations in a double blind trial in ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 1976; 24: 249-258.

Cominelli F ZC, Dinarello CA Sulfasalazine inhibits cytokine production in human mononuclear cells: A novel anti-inflammatory mechanism. *Gastroenterology* 1992; 96:A96.

Cho J. Genetics: molecular and chromosomal considerations. In: Sartor RB, Sandborn WJ. *Inflammatory Bowel Disease*, 6ª. Edição, Saunders, London; 2004. p.105-119.

Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. *JAMA* 1932; 99: 1923-1939.

Damião AOMC, Rodrigues M, Damião EBC et al. Doença Inflamatória Intestinal. *Rev Bras Méd* 2006; 63: 108-122.

Daig R, Angus T, Aschenbrenner E, Falk W, Schölmerich J, Gross V. Increased interleukin 8 expression in the colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1996; 38: 216-222.

Denise K, Bonen, Cho JH. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2003; 124: 521-536.

Dinarrello CA. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 1991; 77: 1627-1652.

Dinarello CA, Wolff SM. The role of interleukin-1 in disease. *N Engl J Med* 1993; 328: 106-113.

Dinarelo CA. Biologic basis for interleukin-1 disease. *Blood* 1996; 87: 2095-2147.

Dionne S, Hiscott J, D'Agata I, Duhaime A, Seidman EG.. Quantitative PCR analysis of TNF  $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mRNA levels in pediatric biopsies. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 1557- 1566.

Eckmann L, Kagnoff MF, Fierer J. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect Immun.*1993; 61: 4569–74.

Elion GB. Pharmacologic and physical agents. Immunosuppressive agents. *Transplant Proc* 1977; 9: 975-979

Elson CO. Commensal bacteria as targets in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2000; 119: 254-7

Fergusson A. Ulcerative colitis and Crohn's disease: important and disabling diseases, still under research. *BMJ* 1994; 309: 355-356.

Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998; 115: 182-205

Grimm MC, Elsbury SK, Pavli P, Doe WF. Interleukin 8: cels of origin of inflammatory bowel disease. *Gut* 1996; 38: 90-98.

Grisham MB. Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1994; 344: 859-861.

Guy-Grand D, DiSanto JP, Henchoz P, Malassis-Seris M, Vassalli P. Small bowel enteropathy: role of intraepithelial lymphocytes and of cytokines (IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF) in the induction of epithelial cell death and renewal. *Eur J Immunol* 1998; 28: 730-44.

Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, Rachmele, Witz D, Wolf DC, Olson A, Bao W, Rugerts P. Maintenance Infliximab for Crohn's disease; the ACCENT I randomised trial. *LANCET* 2002; 359: 1541-1549.

Hanauer S, Sandborn W, Rugerts P, Fedorak R, Lukas M, Macintosh D, Panaccione R, Wolf D, Pollack P. Human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody (adalimumab) in Crohn's disease: the CLASSIC I trial. *Gastroenterology* 2006; 130: 323-333.

Hampe J, Cuthbert A, Croucher P, Mirza M, Mascheretti S, Fisher S, Frenzel H, King K, Hasselmeyer A, MacPherson A. Association between insertion mutation in gene and Crohn's disease in German and British populations *The Lancet*, 2001; 357: 1925-1928.

Hollander D, Vadhein C, Brettholz E, Pettersen GM, Delahunty, Rotter JI. Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. *Ann Inter Med* 1986; 105: 883-885.

Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 599-603

Ina K, Itoh J, Fukushima K, Kusugami K, Yamaguchi T, Kyokane K, Imada A, Binion D, Musso A, West G, Dobreá G, Mc Cormick TS, Lapitina EG, Lurne A, Ottaway C, Fiocchi C. Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated to Bcl/Bax mucosal imbalance. *J Immunol* 1999; 163:1081-90.

Keighley MRB, Yamamoto T, Bain IM, Connolly AB. Gastroduodenal fistulas in Crohn's disease. *Diseases of Colon and Rectum* 1998; 41: 1287-1292.

Koutrobakis I, Manousos ON, MewwissenSGM, Pena AS. Environmental risk factors in inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology* 1996; 43: 381-393.

Kurata JH, Kantor-Fish S, Frankl H, Godby P, Vadhein CM. Crohn's disease among ethnic groups in a large health maintenance organization. *Gastroenterology* 1992; 102: 1940-1948.

Leal RF, Coy CSR, Velloso LA, Ayrizono MLS, Fagundes JJ, Milanski M, Coope A, Góes JRN. Atividade inflamatória em mucosa de reservatório ileal na polipose adenomatosa familiar e retocolite ulcerativa inespecífica. Avaliação da expressão de TNF -a e IL-1B, e da ativação NF - KB. *Revista Brasileira de Colo-Proctologia*, v. 26, p. 399-405, 2006.

Leal RF, Coy CSR, Ayrizono MLS, Fagundes JJ, Milanski M, Velloso LA, Góes JRN. Differential expression of pro-inflammatory cytokines and a pro-apoptotic protein in pelvic ileal pouches for ulcerative colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*, v. 1, p. 2-19, 2007.

Lenardo MJ, Baltimore D. NF-kappa B: a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell* 1989; 58:227-229.

Lennard L. The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. *Eur J Clin Pharmacol* 1992; 43:329-339

Levenstein S, Prantera C, Varvo V, Scribano ML, Andreoli A, Luzi C, Arca M, Berto E, Milete G, Maccheggeano A. Stress and exacerbation in ulcerative colitis: a prospective study of patients enrolled in remission. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 1213-1220.

Ligumsky M, Karmeli F, Sharon P, Zor U, Cohen F, Rachmilewitz D. Enhanced thromboxane A2 and prostacyclin production by cultured rectal mucosa in ulcerative colitis and inhibition by steroids and sulfasalazine. *Gastroenterology* 1981; 81: 444-449.

Ligumsky M, Simon PL, Karmeli F, Rachmilewitz D. Role of interleukin 1 in inflammatory bowel disease: enhanced production during active disease. *Gut* 1990; 31: 686-689.

Lugering A, Schmidt M, Lugering N, Pauels HG, Domschke W, Kucharzik T. Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohn's disease by using caspase-dependent pathway. *Gastroenterology* 2001; 121: 1145-1157.

Mahida YR, Wu K, Jewell DP. Enhanced production of interleukin 1- $\beta$  by mononuclear cells isolated from mucosa with active ulcerative colitis or Crohn's disease. *Gut* 1989; 30:835-838.

Mayberry JF, Judd D, Smart H, Rhodes J, Calcraft B, Morris J. Crohn's disease in Jewish people – an epidemiological study in south-east Wales. *Digestion* 1986; 35: 237-240.

Mawdsley JE, Rampton DS. Psychological stress in IBD: New insight into pathogenic and therapeutic implications. *Gut* 2005; 54: 1481-1491

Mazzucchi L, Hauser C. Expression of interleukin 8 gene in inflammatory bowel disease is related to the histologic grade of inflammation. *Am J Pathol* 1994; 144: 997 – 1007.

Mitsuyama K, Toyonaga A, Sasaki E, Watanabe K, Tateishi H, Nishiyama T, Saiki T, Ikeda H, Tsuruta O, Yanikawa K. IL-8 as an important chemoattractant for neutrophils in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 1994; 96: 432-436.

Munkholm P, Langholz E, Nilsen OH. Incidence and prevalence of Crohn's disease in the County of Copenhagen; 1962-87: a sixfold increase in incidence. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27: 609-614.

Nicholls S, Stephens S, Braegger CP, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Cytokines in stools of children with inflammatory bowel disease or infective diarrhoea. *Journal of Clinical Pathology* 1993; 46:757-760.

Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nuñez G, Cho JH. A frameshift mutation in *NOD2* associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 603-606.

O'Sullivan M, Clayton N, Breslin NP, Harman I, Bountra C, McLaren A, et al. Increased mast cells in the irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2000; 12: 449-57.

Papadakis KA, Targan RS: Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annu Rev Med* 51:289–298, 2000.

Playford R, Ghosh S. Cytokines and growth factor modulators in intestinal inflammation and repair. *J Pathology* 2005; 205: 417-425.

Powrie F. T cells in inflammatory bowel disease: protective and pathogenic roles. *Immunity* 1995; 3: 171-4.

Rachmilewitz D, F Karmeli, L W Schwartz, and P L Simon. Effect of aminophenols (5-ASA and 4-ASA) on colonic interleukin-1 generation *Gut* 1992; 33:929-932.

Reinecker H-C, Steffen M, Witthoef T, Pflueger I, Schreiber S, MacDermott M, Raedler A. Enhanced secretion of tumour necrosis factor- alpha, IL-6, and IL-1 by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol.* 1993; 94:174-81.

Rogler G, Brand K, Vogl D, Page S, Hofmister R, Andus T, Kneschel R, Baeuerle P, Scholmerich J, Gross V. Nuclear factor kappa B is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* 1998; 115: 357-369.

Sandborn W, Hanauer SB, Lukas M, Wollf, Isaacs KL, MacIntosh DG, Panaccione R, Rutgeerts P, Pollack PF. Maintenance of remission over 1 year in patients with active Crohn's disease treated with adalimumab: results of CLASSIC II, a blinded, placebo-controlled study. *Gastroenterology* 2005; 100: S311.

Sands BE. Therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2000; 118: S68-S82.

Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear kappa B inflammatory bowel disease. *Gut* 1998; 42: 477-484.

Shanahan F, Deem RL, Targan SR, Niederlehner A. The CD8+ Leu-7+ subset of T cells in Crohn's disease: distinction between cytotoxic and covert suppressor functions. *Clin Exp Immunol* 1990; 80: 387-389.

Shanaham F. Inflammatory Bowel Disease: Immunodiagnostics, Immunotherapeutics, and Ecotherapeutics. *Gastroenterology* 2001; 120:622-635.

Sharon P, Sharon P, Ligumsky M, Rachmilewitz D, Zor U. Role of prostaglandins in ulcerative colitis. Enhanced production during active disease and inhibition by sulfasalazine. *Gastroenterology* 1978; 75: 638-640

Siegel SA, Shealy DJ, Nakada MT, Le J, Woulfe DS, Probert L, Kollias G, Ghrayeb J, Vilcek J, Daddona PE. The mouse/human chimeric monoclonal antibody cA2 neutralizes TNF in vitro and protects transgenic mice from cachexia and TNF lethality in vivo. *Cytokine*, 1995; 7(1):15–25.

Somerville KW, Logan RFA, Edmond M, Lannngman MJS. Smoking and Crohn's disease. *BMJ* 1984; 289: 954 – 956

Szawlowski PW, Al-Safi AS, Dooley T, Maddocks JL. Azathioprine supresses the mixed lymphocyte reaction of patients with Lesh-Nyhan syndrome. *Br J Clin Pharmacol* 1985; 20: 489-491

Targan SR, Hanauer SB, Van Deventer SJH, Mayer L, Present DH, Brookman T, DeWoody KL, Schaible TF, Rutgeerts PJ. A short term study of chimeric monoclonal antibody (cA2) to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. *N Engl J Med*. 1997; 337: 1029-35.

Tiede I, Fritz G, Strand S, Poppe D, Dvorsky D, Strand D, Lehr HA, Wirtz L, Becker C, Atreya R, Mudter J, Hildner K, Bartsch B, Holtmann M, Blumberg R, Walczak H, Iven H, Galle PR, Ahmadian MR, Neurath MF. CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 2003; 111(8): 1133-1145.

Thiele K, Bierhaus A, Autschbach F, Hofmann M, Stremmel W, Thiele H, Ziegler R, Nawroth PP. Cell specific effects of glucocorticoid treatment on NF-kappaBp65/kappaBalpha system in patients with Crohn's disease. *Gut* 1999;45:693-704. .

Travis SPL, Stange EF, Lémann M, Öresland T, Chowers Y, Forbes A, D'Haens G, Kitis G, Cortot A, Prantera C, Marteau P, Colombel J-F, Gionchetti P, Bouhnik Y, Tiret E, Kroesen J, Starlinger M, Mortensen NJ. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management. *Gut* 2006; 55 (S1): i16-i35.

Van Dullemen HM, Van Deventer SJ, Hommes DW, Bijl HA, Jansen J, Tytgat GN, Woody J. Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2). *Gastroenterology* 1995; 109(1):129-135.

Velloso LA, Folli F, Sun XJ, White MF, Saad MJ, Kahn CR. Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:12490-12495.

Yang H, Compton RF, Sandborn WJ, Lindor NM, Tremaine WJ, Davis MD, Khalil AA, Tountas NA, Tyan DB, Landers CJ, Taylor KD, Viggiano TR, Matteson EL, Schroeter AL, Plevy SE, Cominelli F, Targan SR, Rotter JI. A new syndrome of Crohn's disease and pachydermoperiostosis in a family. *Gastroenterology* 1997, 112: 241-249.

Youngman KR, Simon PL, West GA, Cominelli F, Rachmilewitz D, Klein JS, and Fiocchi C. Localization of intestinal interleukin 1 activity and protein and gene expression to lamina propria cells. *Gastroenterology* 1993; 104: 749-758.

Weterman IT, Pena AS: Familial incidence of Crohn's disease in the Netherlands and a review of the literature. *Gastroenterology* 1984; 86:449-452.

## **8- ANEXOS**



## ANEXO 1

### GRUPO I - MESALAZINA

PACIENTE	IDADE	SEXO	OBSERVAÇÕES
C.F.S	47	F	MESALAZINA FENITOÍNA AMIODARONA
B.F.	39	F	MESALAZINA
F.B	75	M	MESALAZINA OPERADO POR SUBOCLUSÃO
O.S.R.	34	F	TEMPO DE ISQUEMIA DE 2 HS MESALAZINA CORTICÓIDE SUSPENSO HÁ 30 DIAS
S.M.A.	41	F	MESALAZINA CIPROFLOXACINO E METRONIDAZOL
A.A.F.	28	F	MESALAZINA
R.A.T.	33	M	MESALAZINA CIPROFLOXACINO E METRONIDAZOL

## ANEXO 2

### Grupo II – Azatioprina

PACIENTE	IDADE	SEXO	OBSERVAÇÕES
C.A.S.	43	M	AZATIOPRINA 100mg
J.R.B.	45	M	AZATIOPRINA 100mg
A.M.F.	31	M	AZATIOPRINA 100mg BX COLONO
C.F.S	48	F	AZATIOPRINA 150 mg
E.M.O.	29	M	AZATIOPRINA 150mg
S.G.D.	36	F	AZATIOPRINA 150mg
J.A.M.	30	M	AZATIOPRINA 150mg
C.N.	25	M	AZATIOPRINA 150mg
C.M.F.	57	F	AZATIOPRINA 100mg

### ANEXO 3

#### Grupo Controle

PACIENTE	IDADE	SEXO
L.L.C.	76	F
O.M.R.	68	F
K.K.	75	F
M.P.	50	F
R.A.	47	M
S.A.B	52	M
M.R.P.	42	F
J.S.	63	M
A.S.	48	M

## ANEXO 4

### ANATOMO PATOLÓGICO

NOME	RESULTADO DO EXAME ANATOMO PATOLÓGICO
C.F.S	Processo inflamatório crônico ulcerativo com exuberante tecido de granulação e edema
B.F.	Processo inflamatório crônico ulcerativo rico em eosinófilos com múltiplos granulomas
F.B	Doença de Crohn em atividade com áreas de ulceração
O.S.R.	Doença de Crohn em atividade com áreas de ulceração e fibrose
S.M.A.	Doença de Crohn fistulizante em íleo
A.A.F.	Doença de Crohn em íleo em atividade com extensa erosão de mucosa e fibrose difusa da parede com estenose
R.A.T	EDEMA- Enterite crônica erosiva moderada com hiperplasia linfóide transmural associada ÚLCERA- Processo inflamatório crônico ulcerativo atingindo muscular própria com exsudato fibrino-purulento e hiperplasia linfóide associada (ausência de epitélio glandular na ulceração)
C.A.S.	Doença de Crohn em atividade com áreas de ulceração e fibrose
J.R.B.	Processo inflamatório crônico ulcerativo
A.M.F.	Íleite crônica inespecífica leve em atividade com hiperplasia linfóide reacional
C.F.S	Íleite crônica inespecífica leve com atividade discreta
E.M.O.	Colite crônica inespecífica leve
S.G.D.	Íleite crônica inespecífica leve Atividade leve/moderada
J.A.M	Íleite crônica inespecífica leve sem atividade da doença
C.N.	Íleite crônica inespecífica leve
C.M.F.	Íleite crônica erosiva de leve intensidade

## ANEXO 5

### ÍNDICE DE HARVEY BRADSHAW

Nome	Índice	Bem Estar (0 a 4)	Dor abdominal (0 a 3)	No. Evac. Líqu/dia	Tumoração Abdominal (0 a 3)	Complicações 1 por item
C.F.S	10	Cólica 3	2	2xdia	1	Eritema nodoso, fistula 2
B.F.I	21	3 Diarréia e cólica	Cólicas 3	12 x ao dia liquidadas	Em fid 2	Febre 1
F.B	11	Vômitos e cólic. 3	Cólicas 3	2 x dia	Em fid 2	Estenose 1
O.S.R	8	Cólica 2	Cólica 2	2xdia	Em fid 2	
A.A.F	15	Cólica 2	Cólica 2	10xdia	0	Dor articular 1
S.M.A.	12	Cólicas 4	Dor abdominal freq 3	1 a 2 vezes ao dia	Plastrão em fid 2	Estenose 1
R.A.T.	13	Dor, diarréia 4	Dor abdominal 3	1 a 2 vezes ao dia	Plastrão fid 2	Febre abscesso 2
C.A.S.	13	Cólica emagri. 3	Cólica 2	5xdia	2	Abscesso 1
J.R.B.	1	Bem 0	Sem cólicas 1	s/ diarréia	s/ plastrao	0
A.M.F.	6	2 Dist.	Cólica 1	2xdia	Sem plastrão	Dor articular 1
C.F.S.	10	2	Cólica 1	6xdia	Sem plastrão	0
E.M.O.	8	Regular 3	Cólica 2	2xdia	Fistula	0
S.G.D.	4	Bem 1	Sem cólica 1	2xdia	Sem plastrão	0
J.A.M.	1	Ótimo 0	Sem dor 0	1 evac (s/ diarréia)	Sem plastrão	0
C.N.	2	Ótimo 0	Sem dor 0	2xdia	Sem plastrão	0
C.M.F.	13	2	Cólica 2	8xdia	Sem plastrão	Fístula 1

## ANEXO 6

### Questionário de Inclusão

Nome:

Data de Nascimento:

Telefone:

Idade:

Tempo de doença:    meses,       anos

Sintomas:

Cólicas, sugestivo de suboclusão

Diarréia

Perda de peso  ,    kgs

Fístulas entero-cutâneas

Fístulas perineais

Doença restrita ao delgado

Delgado e cólon

Delgado e períneo

Manifestações extra-intestinais:

Dor articular

Manifestações cutâneas

Outras

Medicação em uso – tempo de uso:

Sulfassalazina

Mesalazina

Prednisona

Infliximab

Exames laboratorias

- albumina

- VHS

## ANEXO 7

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu .....(nome do paciente) estou ciente de estar participando de trabalho/pesquisa que objetiva auxiliar no entendimento dos mecanismos da Doença de Crohn (da qual sou portador). Fui informado de que minha participação neste trabalho não mudará as condutas que serão tomadas em relação a minha doença – o tratamento será o mesmo independentemente de eu estar ou não colaborando para este trabalho. Estou ciente, também de não existirem riscos adicionais por estar participando desta pesquisa uma vez que eu já teria que ser submetido aos procedimentos de colonoscopia ou cirurgia como forma de acompanhamento e tratamento da minha doença

Autorizo e concordo, caso seja submetido a colonoscopia, que sejam colhidas biópsias de íleo terminal e enviadas para este estudo e que seja colhida amostra de sangue periférico. Caso seja submetido a cirurgia concordo que fragmentos de mucosa do segmento de intestino ressecado sejam enviados para o estudo. Estou ciente de que este material coletado ficará armazenado em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  no laboratório de Biologia Molecular – FCM sob responsabilidade da Dra Ana Paula Paiva Moreira por período de até 5 anos e que poderá eventualmente ser utilizado para outra pesquisa após minha autorização.

Me prontifico a fornecer informações clínicas sobre meu estado geral e a evolução da minha doença , caso seja necessário; sabendo que estas informações serão mantidas em sigilo e utilizadas somente para realização desta pesquisa.

Data \_\_\_\_\_

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

Assinatura do médico responsável \_\_\_\_\_

Qualquer duvida existente poderá ser esclarecida pela médica responsável pela pesquisa – Dra Ana Paula Paiva Moreira telefone 99999999 ou pelo Comitê de Ética em pesquisa 37888936.

## ANEXO 8

Parecer de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP

☎ (0\_19) 3788-8936

FAX (0\_19) 3788-7187

🌐 [www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

✉ [cep@fcm.unicamp.br](mailto:cep@fcm.unicamp.br)

CEP, 11/10/05.

(Grupo III)

**PARECER PROJETO:** N° 526/2005

**CAAE:** 1464.0.146.000-05

### I-IDENTIFICAÇÃO:

— PROJETO: “**AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DO TNF ALFA, DO NFK BETA E DA INTERLEUCINA 1 BETA EM PACIENTES PORTADORES DE DOENÇA DE CROHN EM ÍLEO TERMINAL**”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Ana Paula Paiva Moreira

INSTITUIÇÃO: HC/Unicamp

APRESENTAÇÃO AO CEP: 12/09/05

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 27/09/06

### II - OBJETIVOS

Avaliar a expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF-alfa e IL-1beta em fragmentos de íleo terminal de pacientes com diagnóstico estabelecido de doença de Crohn. Comparar níveis teciduais e séricos desta citocinas entre indivíduos controle e pacientes tratados com mesalazina e azatioprina

### III - SUMÁRIO

Trata-se de um estudo clínico prospectivo no qual serão estudados dois grupos de pacientes portadores de doença de Crohn; um sob tratamento com mesalazina e outro utilizando azatioprina, ambos serão submetidos à colonoscopia com biópsia e fornecerão amostra de sangue para determinação da concentração de citocinas. Para comparação de resultados será utilizado o teste T de Student para dados não pareados; quando necessário será realizada análise de variância com teste para comparação de múltiplas médias.

### IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

A pesquisa poderá contribuir para elucidar aspectos de uma doença cuja etiopatogenia ainda não está completamente esclarecida, os objetivos são claros, a metodologia bem descrita, definindo quem são os sujeitos do estudo, incluindo os testes laboratoriais e análise estatística.

### V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e

- 1 -

atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

#### **VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES**

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

#### **VII - DATA DA REUNIÃO**

Homologado na IX Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 27 de setembro de 2005.

  
**Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo**  
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP