



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

Luiz Augusto Cardoso Lacombe

**Análise da Permeabilidade Intestinal Através da Dosagem Sérica de Zonulina e sua Relação com Escores de Atividade Clínica e Marcadores Inflamatórios em Pacientes com Doença Inflamatória Intestinal**

FLORIANÓPOLIS

2021

Luiz Augusto Cardoso Lacombe

**Análise da Permeabilidade Intestinal Através da Dosagem Sérica de Zonulina e sua Relação com Escores de Atividade Clínica e Marcadores Inflamatórios em Pacientes com Doença Inflamatória Intestinal**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Ciências Médicas.

Orientador Prof. Dr. Leonardo de Lucca Schiavon.

FLORIANÓPOLIS

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Lacombe, Luiz Augusto Cardoso

Análise da Permeabilidade Intestinal Através da Dosagem Sérica de Zonulina e sua Relação com Escores de Atividade Clínica e Marcadores Inflamatórios em Pacientes com Doença Inflamatória Intestinal / Luiz Augusto Cardoso Lacombe ; orientador, Leonardo de Lucca Schiavon, 2021.

106 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas-Novo, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Ciências Médicas-Novo. 2. doença inflamatória intestinal . 3. permeabilidade intestinal. 4. zonulina . 5. citocinas inflamatórias. I. Schiavon, Leonardo de Lucca. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas-Novo. III. Título.

Luiz Augusto Cardoso Lacombe

**Análise da Permeabilidade Intestinal Através da Dosagem Sérica de Zonulina e sua Relação com Escores de Atividade Clínica e Marcadores Inflamatórios em Pacientes com Doença Inflamatória Intestinal**

O presente trabalho, em nível de mestrado, foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Leonardo de Lucca Schiavon, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Alexandre Sherlley Casimiro Onofre, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Livia de Almeida Costa, Dra.  
Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em ciências médicas.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof. Leonardo de Lucca Schiavon, Dr.  
Orientador

Florianópolis, 2021

*Aos meus pais, Maria Eloisa e Carlos Alberto, por todo o amor e pelos exemplos de trabalho, dedicação e responsabilidade.*

*À minha esposa, Amanda, esposa querida, quem suavizou os momentos difíceis e foi fonte de estímulo constante, pelos momentos que lhe faltei.*

## **AGRADECIMENTOS**

A realização deste trabalho foi possível através da ajuda de pessoas que acreditaram no desenvolvimento desta pesquisa – a estas pessoas aqui estão os meus agradecimentos:

Ao Prof. Dr. Leonardo de Lucca Schiavon, que aceitou este desafio e contribuiu de forma valiosa para o seu desenvolvimento, pelo exemplo como pesquisador, médico comprometido e dedicado a seus pacientes e por estar sempre disponível, dando todo o apoio necessário para a realização deste trabalho.

À Dra. Camila Matiollo, farmacêutica-bioquímica dedicada, que auxiliou na organização, no armazenamento e na análise das amostras laboratoriais relacionadas a esta pesquisa.

Aos profissionais responsáveis pelo ambulatório de doença inflamatória intestinal do HU-UFSC, em especial à colega Vivian de Souza Menegassi, por permitir a minha permanência na rotina semanal do ambulatório em busca dos dados necessários a esta pesquisa.

Aos pacientes que se encontram em acompanhamento no ambulatório de doença inflamatória intestinal do HU-UFSC, por serem atenciosos e cederem parte do seu valioso tempo para a realização da pesquisa, além de contribuírem para o aprendizado de inúmeros profissionais desta instituição.

Ao Prof. Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco, pela sua disponibilidade e atenção no auxílio das análises de biomarcadores séricos necessários para a realização deste trabalho.

A todos que participaram do grupo controle e cederam o seu precioso tempo, disponibilizando-se para a coleta de material biológico, fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do laboratório central do HU-UFSC, que desempenham um trabalho diário essencial para o funcionamento da instituição e que realizaram as coletas dos materiais biológicos dos pacientes que participaram desta pesquisa.

Aos meus pais, Maria Eloisa Cardoso Lacombe e Carlos Alberto Grijó Lacombe, atenciosos em todos os momentos vividos, por terem me dado oportunidades valiosas para o meu desenvolvimento ao longo da minha jornada e por estarem presentes nas mais importantes etapas da minha vida.

À minha amada esposa, Amanda Meneses Ferreira Lacombe, que esteve ao meu lado, de forma amorosa e atenciosa, em todas as etapas deste trabalho, por ter sempre acreditado nesta escolha e ter contribuído tanto com críticas construtivas como com a revisão detalhada da tese.

A Deus, pela oportunidade de crescimento e por me permitir novas realizações e conquistas. Que Ele sempre esteja presente em minha vida e que me guie para caminhos de prosperidade.

## Agradecimentos Especiais

À FAPESC – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Santa Catarina (PPSUS, termo de Outorga 2014TR1952), que financiou parcialmente a execução deste projeto, pela confiança que dedica à pesquisa científica.



*“Esforce-se para não ser um sucesso, mas sim  
para ser valioso”*

*Albert Einstein*

## RESUMO

Lacombe, LAC. *Análise da Permeabilidade Intestinal Através da Dosagem Sérica de Zonulina e sua Relação com Escores de Atividade Clínica e Marcadores Inflamatórios em Pacientes com Doença Inflamatória Intestinal* [dissertação]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2021.

**Introdução:** A doença inflamatória intestinal (DII) compreende o espectro entre a doença de Crohn (DC) e a colite ulcerativa (UC), condição cuja prevalência em países como o Brasil vem aumentando significativamente nos últimos anos. A fisiopatologia da DII não está totalmente conhecida, mas sabidamente o processo inflamatório crônico associa-se a uma resposta imunológica inadequada e ocorre, sobretudo, em indivíduos geneticamente predispostos sob um contexto ambiental favorável ao desenvolvimento dessa condição. Alterações na função de barreira do epitélio intestinal e, conseqüentemente, um aumento da permeabilidade intestinal, têm sido citados como fatores importantes na patogênese de diferentes condições autoimunes, entre elas, a DII. **Objetivos:** Estudar as concentrações séricas da zonulina em pacientes portadores de DII e a sua relação com índices clínicos de atividade da doença e marcadores inflamatórios circulantes. **Métodos:** Estudo observacional transversal que incluiu 117 pacientes com DII e 32 indivíduos que compuseram o grupo controle. Foram coletados dados epidemiológicos e clínicos dos pacientes com DII e aplicados escores de atividade clínica. Do ponto de vista laboratorial, todos os indivíduos foram submetidos à coleta de sangue periférico para realização de exames usuais e para determinação das concentrações de proteína C reativa (PCR), zonulina e de citocinas inflamatórias. **Resultados:** Dentre os pacientes com DII, a média de idade foi de  $44,0 \pm 15,9$  anos, com uma predominância do sexo feminino (66,7%). Em relação ao diagnóstico estabelecido, 60 (51,3%) pacientes eram portadores de DC; apenas 16,2% dos pacientes já haviam sido submetidos a intervenções cirúrgicas relacionadas à DII. No momento da avaliação clínico-laboratorial, 56,7% dos pacientes com DC encontravam-se em remissão clínica e, dentre os pacientes com UC, 59,2% deles assim se encontravam. Não foram observadas diferenças estatísticas na concentração sérica da zonulina entre pacientes com DII (95,28 ng/mL) e indivíduos do grupo controle (96,61 ng/mL;  $p = 0,573$ ). Dentre os pacientes com DII, as concentrações da zonulina foram estatisticamente mais elevadas no sexo feminino e correlacionaram-se positivamente com o índice de massa corporal (IMC). Nos pacientes com DC, as concentrações da zonulina não se correlacionaram com o índice de atividade da doença, mas, dentre os pacientes com UC, a concentração da zonulina correlacionou-se positivamente com o índice de atividade da doença ( $p = 0,041$ ). Em relação às citocinas inflamatórias, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação às concentrações entre pacientes com DII e o grupo controle. As concentrações da zonulina não se correlacionaram às das citocinas circulantes entre os pacientes com DII. Dentre os pacientes com DII, aqueles que apresentaram história de internação hospitalar prévia relacionada a essa condição demonstraram concentrações séricas de IFN- $\gamma$  e IL-17A estatisticamente mais elevadas do que pacientes sem esse antecedente ( $p = 0,030$  e  $p = 0,024$ , respectivamente). **Conclusões:** Neste estudo, que incluiu majoritariamente pacientes com DII bem controlada, a concentração sérica da zonulina e de diferentes citocinas inflamatórias não diferiu entre pacientes com DII e indivíduos sem essa condição. Observaram-se concentrações mais elevadas da zonulina em pacientes do sexo feminino e em pacientes com valores mais elevados de IMC. A concentração sérica da zonulina relacionou-se com a atividade clínica na UC, mas não na DC.

Descritores: doença inflamatória intestinal; permeabilidade intestinal; zonulina; citocinas inflamatórias; atividade da doença.

## ABSTRACT

Lacombe, LAC. *Analysis of Intestinal Permeability Through Serum Zonulin and its Relation with Clinical Activity Scores and Inflammatory Markers in Patients with Inflammatory Bowel Disease* [dissertação]. Florianópolis: “Universidade Federal de Santa Catarina”; 2021.

**Introduction:** Inflammatory bowel disease (IBD) comprises the spectrum between Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), a condition whose prevalence in countries such as Brazil has increased significantly in recent years. The pathophysiology of IBD is not fully understood, but it is known that the chronic inflammatory process is associated with an inadequate immune response and occurs, mainly, in genetically predisposed individuals under a favorable environmental context to the development of this condition. Changes in the intestinal epithelial barrier function and, consequently, an increase in intestinal permeability, have been suggested as important factors in the pathogenesis of different autoimmune conditions, including IBD. **Objectives:** To study serum zonulin concentrations in patients with IBD and their relationship with clinical indices of disease activity and circulating inflammatory markers. **Methods:** This was a cross-sectional observational study that included 117 patients with IBD and 32 individuals who made up the control group. Epidemiological and clinical data were collected from patients with IBD and clinical activity scores were applied. All subjects underwent peripheral blood collection to perform the usual tests and to determine the concentrations of C-reactive protein (CRP), zonulin and inflammatory cytokines. **Results:** Among patients with IBD, the mean age was  $44.0 \pm 15.9$  years, with a predominance of female gender (66.7%). Regarding the established diagnosis, 60 (51.3%) patients had CD; only 16.2% of patients had already undergone surgical interventions related to IBD. At the time of clinical and laboratory evaluation, 56.7% of patients with CD were in clinical remission and, among patients with CU, 59.2% of them presented with this clinical status. There were no statistical differences in serum zonulin concentrations between patients with IBD (95.28 ng/mL) and the control group (96.61 ng/mL;  $p = 0.573$ ). Among patients with IBD, zonulin concentrations were statistical higher in females and correlated positively with body mass index (BMI). In patients with CD, zonulin concentrations did not correlate with disease activity index, but among patients with UC, zonulin concentrations correlated positively with disease activity index ( $p = 0.041$ ). Regarding inflammatory cytokines, we did not observe a statistically significant difference in relation to these concentrations between patients with IBD and the control group. Zonulin concentrations did not correlate with circulating cytokines among IBD patients. Among patients with IBD, those who had a history of hospital admission related to this condition demonstrated statistical higher serum concentrations of IFN- $\gamma$  and IL-17A than patients without this history ( $p = 0.030$  and  $p = 0.024$ , respectively). **Conclusions:** In this study, which mostly included patients with well-controlled IBD, the serum concentration of zonulin and different inflammatory cytokines did not differ between patients with IBD and individuals without this condition. Higher concentrations of zonulin were observed in female patients and in patients with higher BMI values. The serum concentration of zonulin was related to clinical activity in UC, but not in CD.

Descriptors: inflammatory bowel disease; intestinal permeability; zonulin; inflammatory cytokines; disease activity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração esquemática das junções estreitas (“ <i>tight junctions</i> ”) fechadas na ausência de ligação da zonulina aos receptores EGFR e PAR <sub>2</sub> .....	34
Figura 2 – Ilustração esquemática das junções estreitas (“ <i>tight junctions</i> ”) abertas quando da ativação dos receptores EGFR pela ligação da zonulina aos mesmos e quando da transativação dos receptores EGFRs pela ligação da zonulina ao receptor PAR <sub>2</sub> .....	35
Figura 3 – Concentração sérica da zonulina em pacientes com doença inflamatória intestinal (n=117) e nos indivíduos do grupo controle (n=32) .....	50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação de Montreal para doença de Crohn .....	24
Tabela 2 – Classificação de Montreal para colite ulcerativa .....	25
Tabela 3 – Principais medicamentos utilizados no tratamento da doença inflamatória intestinal .....	28
Tabela 4 – Escore de atividade clínica <i>Simple Clinical Colitis Activity Index</i> (SCCAI) para colite ulcerativa .....	30
Tabela 5 – Índice de Harvey-Bradshaw para avaliação da atividade clínica na doença de Crohn .....	31
Tabela 6 – Características da casuística (pacientes com doença inflamatória intestinal; n= 117) .....	45
Tabela 7 – Descrição das características intrínsecas à doença nos pacientes com doença de Crohn (n=60) e naqueles com colite ulcerativa (n=57) .....	47
Tabela 8 – Frequência dos tratamentos realizados pelos pacientes com doença inflamatória intestinal .....	48
Tabela 9 – Comparação da idade e dos parâmetros laboratoriais entre os pacientes com doença inflamatória intestinal (n=117) e os indivíduos do grupo controle (n=32) .....	49
Tabela 10 – Descrição da concentração sérica da zonulina nos pacientes com doença inflamatória intestinal de acordo com as variáveis sexo, diagnóstico, procedimento cirúrgico prévio e internação hospitalar prévia .....	51
Tabela 11 – Correlação entre a concentração sérica da zonulina e as variáveis idade, índice de massa corporal, escores de atividade clínica e parâmetros laboratoriais em pacientes com doença inflamatória intestinal .....	52
Tabela 12 – Avaliação da concentração sérica da zonulina nos pacientes com doença de Crohn em relação às características clínicas, atividade da doença (índice de Harvey-Bradshaw) e comportamento da doença .....	55
Tabela 13 – Avaliação da concentração sérica da proteína C reativa e da albumina nos pacientes com doença de Crohn em relação às características clínicas, atividade da doença (índice de Harvey-Bradshaw) e comportamento da doença .....	56

Tabela 14 – Avaliação da concentração sérica da zonulina nos pacientes com colite ulcerativa em relação às características clínicas, atividade da doença e extensão do acometimento .....	59
Tabela 15 – Avaliação da concentração sérica da proteína C reativa e da albumina nos pacientes com colite ulcerativa em relação às características clínicas, atividade da doença e extensão do acometimento .....	60
Tabela 16 – Concentrações séricas de TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 e a comparação destas entre os pacientes com doença inflamatória intestinal (n=114) e os indivíduos do grupo controle (n=8) .....	62
Tabela 17 – Concentrações séricas de TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 de acordo com o sexo dos pacientes com doença inflamatória intestinal .....	62
Tabela 18 - Concentrações séricas de TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 de acordo com o diagnóstico da doença inflamatória intestinal .....	63
Tabela 19 - Concentrações séricas de TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 de acordo com o histórico de internação hospitalar prévia nos pacientes com doença inflamatória intestinal .....	64
Tabela 20 - Concentrações séricas de TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 de acordo com o histórico de procedimento cirúrgico prévio nos pacientes com doença inflamatória intestinal .....	64
Tabela 21 - Correlação das concentrações séricas de TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 com a concentração sérica da zonulina nos pacientes com doença inflamatória intestinal .....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
cm	Centímetros
DC	Doença de Crohn
DII	Doença inflamatória intestinal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECCO	<i>European Crohn's and Colitis Organisation</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FA	Fosfatase Alcalina
GGT	Gama-glutamilttransferase
HU-UFSC	Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina
IHB	Índice de Harvey-Bradshaw
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL	Interleucina
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-21	Interleucina 21
IL-22	Interleucina 22
IL-23	Interleucina 23
IL-17A	Interleucina 17A
IL-17F	Interleucina 17F
IMC	Índice de massa corporal
JAK	Janus quinase
kDa	Quilodalton
L	Litro
mg	Miligramas
mm	Milímetros



mg/L	Miligramas por litro
mg/mL	Miligramas por mililitro
nm	Nanômetro
ng/mL	Nanogramas por mililitro
PCR	Proteína C reativa
SCCAI	<i>Simple Clinical Colitis Activity Index</i>
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences Software</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
Th1	Células T <i>helper</i> do tipo 1
Th2	Células T <i>helper</i> do tipo 2
Th9	Células T <i>helper</i> do tipo 9
Th17	Células T <i>helper</i> do tipo 17
Th22	Células T <i>helper</i> do tipo 22
TNF	Fator de necrose tumoral
UC	Colite ulcerativa
µg/dL	Microgramas por decilitro
µg/mL	Microgramas por mililitro

## LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Parecer consubstanciado do comitê de ética em pesquisa (CEP) .....	79
Anexo B – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) .....	83
Anexo C – Instrumento para coleta de dados clínicos .....	85
Anexo D – Instrumento para coleta de exames laboratoriais .....	90
Anexo E – Instrumento para coleta do grupo controle .....	91
Anexo F – Artigo submetido à revista <i>Arquivos de Gastroenterologia</i> .....	92

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>22</b>
1.1	DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL	22
1.1.1	<b>Aspectos gerais e epidemiológicos</b>	<b>22</b>
1.1.2	<b>Fisiopatologia</b>	<b>22</b>
1.1.3	<b>Características clínicas</b>	<b>23</b>
1.1.4	<b>Diagnóstico da doença inflamatória intestinal</b>	<b>24</b>
1.1.5	<b>Tratamento da doença inflamatória intestinal</b>	<b>27</b>
1.1.6	<b>Índices de atividade clínica na doença inflamatória intestinal</b>	<b>29</b>
1.1.7	<b>A proteína C reativa e seu papel na doença inflamatória intestinal</b>	<b>32</b>
1.2	PERMEABILIDADE INTESTINAL E ZONULINA	32
1.3	O SISTEMA IMUNOLÓGICO E A PARTICIPAÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NA DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL	35
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>38</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>39</b>
3.1	OBJETIVO GERAL	39
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
<b>4</b>	<b>MÉTODOS</b>	<b>40</b>
4.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	40
4.2	DELINEAMENTO DO ESTUDO	40
4.3	POPULAÇÃO DO ESTUDO	40
4.4	PROCEDIMENTOS E VARIÁVEIS DO ESTUDO	41
4.4.1	<b>Procedimentos</b>	<b>41</b>
4.4.2	<b>Variáveis do estudo</b>	<b>41</b>
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>44</b>
5.1	CARACTERÍSTICAS DA CASUÍSTICA	44
5.2	ANÁLISE COMPARATIVA DA IDADE E DOS PARÂMETROS LABORATORIAIS ENTRE OS PACIENTES COM DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL E OS INDIVÍDUOS DO GRUPO CONTROLE	48
5.3	A CONCENTRAÇÃO SÉRICA DA ZONULINA COMO MARCADOR DE PERMEABILIDADE INTESTINAL	49

5.3.1	A concentração sérica da zonulina e a sua comparação entre os pacientes com doença inflamatória intestinal e o grupo controle .....	49
5.3.2	A concentração sérica da zonulina como marcador de permeabilidade intestinal em pacientes com doença inflamatória intestinal .....	50
5.3.3	Análise da correlação entre a concentração sérica da zonulina e variáveis como a idade, índice de massa corporal, escores de atividade clínica da doença e parâmetros laboratoriais em pacientes com doença inflamatória intestinal .....	51
5.3.4	Análise da concentração sérica da zonulina, proteína C reativa e albumina e comparação das mesmas com características clínicas, escore de atividade clínica (índice de Harvey-Bradshaw) e comportamento da doença em pacientes com doença de Crohn .....	52
5.3.5	Análise da concentração sérica da zonulina, proteína C reativa e albumina e comparação das mesmas com características clínicas, escore de atividade clínica ( <i>Simple Clinical Colitis Activity Index</i> ) e extensão do acometimento da doença em pacientes com colite ulcerativa .....	56
5.4	ANÁLISE DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 .....	61
5.4.1	Análise das concentrações séricas de TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 e a comparação destas entre os pacientes com doença inflamatória intestinal e o grupo controle .....	61
5.4.2	Análise das concentrações séricas de TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 e a comparação destas com o sexo e características clínicas em pacientes com doença inflamatória intestinal .....	62
5.4.3	Análise da correlação entre as concentrações séricas de TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 e a concentração sérica da zonulina em pacientes com doença inflamatória intestinal .....	65
6	DISCUSSÃO .....	66
7	CONCLUSÕES .....	73
8	REFERÊNCIAS .....	74
	ANEXO A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa .....	79
	ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	83
	ANEXO C – Instrumento para coleta de dados clínicos .....	85

<b>ANEXO D – Instrumento para coleta de exames laboratoriais .....</b>	<b>90</b>
<b>ANEXO E – Instrumento para coleta do grupo controle .....</b>	<b>91</b>
<b>ANEXO F – Artigo submetido à revista Arquivos de Gastroenterologia .....</b>	<b>92</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

### 1.1.1 Aspectos gerais e epidemiológicos

A doença inflamatória intestinal (DII) compreende o espectro entre a colite ulcerativa (UC) e a doença de Crohn (DC). Ambas são condições imunomediadas caracterizadas por inflamação intestinal crônica, estando associadas a uma maior morbimortalidade e a elevados custos ao sistema de saúde (1).

A prevalência da DII é variável de acordo com as várias regiões geográficas do mundo. Ainda que países desenvolvidos, como aqueles pertencentes ao continente europeu, apresentem os maiores índices da doença, nos últimos anos, a incidência da DII vem aumentando nas regiões em desenvolvimento como em países da Ásia e da África, em países da Europa oriental e em países da América do Sul, como no Brasil (2, 3).

Uma revisão sistemática baseada em estudos populacionais e publicada por autores de diferentes centros em 2017 demonstrou que, no Brasil, no período entre 1988 e 2016, observou-se um aumento na porcentagem anual de casos de 11,1% (IC95% 4,8-17,8) para DC e de 14,9% (IC95% 10,4-19,6) para UC (3). No que se refere a números absolutos, uma revisão sistemática realizada na América Latina evidenciou que a incidência da DC no Brasil aumentou significativamente nas últimas quatro décadas, aumentando de 0,08 casos por 100.000 habitantes em 1988 para 0,68 casos por 100.000 habitantes entre 1991 e 1995, para 3,5 casos por 100.000 habitantes entre 2001 e 2005 e para 5,48 casos por 100.000 habitantes em 2015 (4).

### 1.1.2 Fisiopatologia

A fisiopatologia da DII não está, até o momento, totalmente esclarecida, mas fatores genéticos, ambientais e fatores intrínsecos relacionados ao indivíduo portador dessa condição contribuem para o desenvolvimento da inflamação intestinal.

Do ponto de vista genético-molecular, a DII é uma doença poligênica, com mais de duzentas e quarenta variantes alélicas conhecidas que acarretam em um maior risco para o desenvolvimento da DII, incluindo variantes em genes cujas proteínas

codificadas influenciam vias intracelulares de reconhecimento de produtos da degradação microbiana, vias da autofagia e aqueles que estão envolvidas na função de barreira epitelial e da regulação da imunidade inata e adaptativa (5).

Muitos fatores ambientais, incluindo o tabagismo, a dieta, medicamentos, poluição da água, variações geográficas, alterações do sono e estresse, foram identificados como fatores de risco para o desenvolvimento e recaídas da DII. Estratégias de saúde pública implementadas em décadas passadas, assim como o uso crescente de antimicrobianos, levaram a mudanças na interação entre o ser humano e os micro-organismos presentes no ambiente. Conseqüentemente, mudanças na microbiota intestinal ocorreram e o desequilíbrio entre bactérias protetoras e patogênicas (disbiose) contribuiu para o desenvolvimento da DII (6).

Diversos estudos relacionados ao microambiente da resposta imunológica foram conduzidos para uma melhor compreensão da fisiopatologia da DII. A perda da homeostase intestinal e do equilíbrio da resposta imunológica presente na lâmina própria são importantes mecanismos encontrados no desenvolvimento da DII. A disfunção das vias imunes inata e adaptativa é considerada fator relevante para a resposta inflamatória intestinal aberrante em pacientes com essa condição. Estudos relacionados com a resposta imune adaptativa resultou na compreensão de que a DC e a UC relacionam-se a vias imunológicas distintas de inflamação intestinal – acredita-se que a DC seja incitada por uma resposta imune com predomínio de células T *helper* do tipo 1 (Th1), enquanto a UC por uma resposta imune com predomínio de células T *helper* do tipo 2 (Th2) (7). A resposta mediada por células T *helper* do tipo 17 (Th17) também representa uma via de resposta celular envolvida na fisiopatologia da DC, principalmente pela participação de interleucinas pró-inflamatórias secretadas pelas células do sistema imune inato, como por exemplo, pelos macrófagos e por outras células apresentadoras de antígenos (8).

### **1.1.3 Características clínicas**

A DII é uma condição crônica que acomete predominantemente o sistema digestivo e que leva ao desenvolvimento de um processo inflamatório cujo curso clínico é caracterizado por períodos de surto e remissão. Essa doença acomete principalmente indivíduos jovens e em idade laboral, levando, muitas vezes, a uma

perda da produtividade, comprometimento da qualidade de vida e potencial necessidade de internações hospitalares.

A DC pode acometer qualquer região do sistema digestivo, desde a boca até o ânus, com um padrão de acometimento salteado, tendo como principais manifestações clínicas a dor abdominal, a diarreia e a perda ponderal. O processo inflamatório ocorre de forma transmural, acometendo todas as camadas do órgão, podendo levar a complicações como estenoses, abscessos e fístulas perianais (9). A utilização da classificação de Montreal auxilia na caracterização do comportamento e localização da doença nos pacientes portadores dessa condição (10). A Tabela 1 exemplifica a classificação de Montreal para DC.

Tabela 1 – Classificação de Montreal para doença de Crohn.

<b>Idade ao diagnóstico</b>	<b>Localização</b>	<b>Comportamento</b>
A1 – 16 anos ou menos	L1 – Íleo terminal	B1 – Não estenosante e não penetrante
A2 – 17 a 40 anos	L2 – Cólon	B2 – Estenosante
A3 – Mais de 40 anos	L3 – Ileocolônica	B3 – Penetrante
	L4 – Trato digestivo superior	p – Doença perianal associada

A UC acomete predominantemente o cólon, conferindo um padrão de acometimento inflamatório contínuo, inicialmente no reto, mas podendo acometer regiões mais proximais do cólon, sendo restrito à mucosa. Os sintomas estão relacionados com a intensidade da inflamação e com a extensão da mesma e, mais comumente, são diarreia com sangue, tenesmo, urgência evacuatória e dor abdominal. Eventualmente sangramento maciço pode ocorrer (9, 11). Como na DC, a classificação de Montreal também é utilizada para descrever o padrão de acometimento da doença (10). A Tabela 2 exemplifica a classificação de Montreal para UC.



Tabela 2 – Classificação de Montreal para colite ulcerativa.

<b>Termo</b>	<b>Distribuição</b>	<b>Descrição</b>
E1	Proctite	Envolvimento limitado ao reto
E2	Colite esquerda	Envolvimento limitado à porção distal do cólon até a flexura esplênica, também chamada de colite distal
E3	Pancolite	O envolvimento acomete porções proximais a partir da flexura esplênica, incluindo a pancolite

#### 1.1.4 Diagnóstico da doença inflamatória intestinal

O diagnóstico da DC e da UC requer uma avaliação cuidadosa de diferentes aspectos. São fundamentais as informações coletadas por meio da anamnese e da realização do exame físico (aspectos abordados no item anterior (1.1.3)), os exames laboratoriais, como por exemplo, a avaliação das concentrações da proteína C reativa (PCR) (este tópico será explorado com mais detalhes posteriormente) e da calprotectina fecal, dos exames endoscópicos, dos achados histológicos e radiológicos. Dessa forma, é possível perceber que esse conjunto de exames complementares traduzem a heterogeneidade e a complexidade dessa condição. Não há, até o momento, espaço para a utilização de exames sorológicos ou genéticos no diagnóstico da DII (12).

A calprotectina é uma proteína encontrada no citoplasma dos neutrófilos, sendo um marcador inflamatório não invasivo e capaz de ser dosado nas fezes. É uma avaliação útil para a diferenciação entre quadros clínicos funcionais, como por exemplo, a síndrome do intestino irritável e doenças inflamatórias, como a DII. É utilizada, também, no seguimento de pacientes com DII ao longo do seu tratamento e apresenta uma boa correlação com exames endoscópicos na detecção da presença de atividade inflamatória (13).

A endoscopia digestiva, principalmente o exame de ileocolonosopia, apresenta um papel importante no diagnóstico e estadiamento da DII, visto que possibilita a visualização direta da área inflamada e da sua extensão, a realização do diagnóstico diferencial com outras doenças e permite a obtenção de material para a análise histológica. O 3º Consenso da *European Crohn's and Colitis Organisation* (ECCO) descreve que os principais achados em exames de ileocolonosopia na DC são as lesões salteadas (áreas de mucosa inflamada entrepostas com áreas de mucosa de aspecto normal), úlceras de formato longitudinal, podendo estas conferirem um aspecto em “pedra de calçamento”, orifícios fistulosos e estenoses, sendo que, na maioria dos casos, o reto está poupado. Na UC, por sua vez, os achados endoscópicos tem início a partir da borda anal, com um padrão de acometimento contínuo, confluyente e circunferencial, apresentando uma linha demarcatória entre a mucosa inflamada e a mucosa normal. Alguns achados como edema, perda do padrão vascular submucoso, friabilidade e erosões são aspectos comuns a serem observados na UC (14, 15).

O mesmo grupo acima citado (ECCO) descreve os principais achados histológicos encontrados na DII. Na DC, os achados que estão bem estabelecidos e que auxiliam no diagnóstico dessa condição são a inflamação focal crônica rica em linfócitos e plasmócitos, a irregularidade focal de criptas e a presença de granulomas limitados à lâmina própria. Os principais achados histológicos encontrados na UC são o infiltrado plasmocitário focal ou difuso, a distorção arquitetural de criptas, a atrofia da mucosa, um infiltrado inflamatório ocasionando criptite e a presença de abscessos de criptas (14, 15).

Os exames radiológicos desempenham um papel importante no diagnóstico da DII. Na DC, as duas principais modalidades utilizadas são a tomografia computadorizada (TC) e a ressonância magnética (RM) de abdome, ambas auxiliam no diagnóstico do acometimento do intestino delgado (demonstração de espessamento da parede, áreas de estenose, ingurgitamento dos vasos penetrantes, aumento de linfonodos), assim como na detecção de complicações da doença penetrante, como na identificação de fístulas e abscessos. Em casos graves de UC, a realização de uma radiografia simples de abdome auxilia no diagnóstico do megacólon tóxico (dilatação do cólon transversal  $\geq 5,5$  cm), estando a TC de abdome reservada para os casos de suspeita de perfuração (14, 16).

### **1.1.5 Tratamento da doença inflamatória intestinal**

Por ser uma doença crônica e com complicações frequentes, o tratamento da DII é multidisciplinar e envolve diferentes profissionais da área da saúde, como gastroenterologista e/ou proctologista, profissionais da enfermagem, nutricionistas e psicólogos.

A decisão terapêutica é baseada na análise individual de cada caso, levando-se em consideração a intensidade dos sintomas, a extensão do acometimento, a intensidade da atividade inflamatória endoscópica, a presença de manifestações extraintestinais, a presença de doença perianal fistulizante, a refratariedade prévia a algum tratamento e as características particulares de cada indivíduo. De uma forma prática, tanto a DC quanto a UC podem ser classificadas em doença leve, moderada e grave. O tratamento medicamentoso pode ser dividido em duas principais fases, a de indução e a de manutenção (17-19).

O tratamento farmacológico consiste na utilização de medicamentos que atuam de forma local ou sistêmica no processo inflamatório. Exemplos são os aminossalicilatos, glicocorticoides, imunossupressores ou imunomoduladores e imunobiológicos com diferentes mecanismos de ação (20, 21). A Tabela 3 lista os principais medicamentos utilizados na prática clínica e seus mecanismos de ação.

Tabela 3 – Principais medicamentos utilizados no tratamento da doença inflamatória intestinal.

Classe		Mecanismo de ação
5-Aminossalicilatos (mesalazina, sulfassalazina)	(mesalazina,	Ação anti-inflamatória local e restrita à mucosa.
Glicocorticoides hidrocortisona, budesonida)	(prednisona,	Ação anti-inflamatória sistêmica atuando em múltiplos mecanismos envolvidos na resposta inflamatória.
Tiopurinas mercaptopurina)	(azatioprina, 6-	Imunossupressão sistêmica através da inibição da biossíntese de purinas e da inibição da proliferação celular.
Metotrexato		Imunossupressão sistêmica através da inibição da enzima dihidrofolato redutase e consequente bloqueio da síntese de DNA.
Imunobiológicos		
○ Anti-TNF $\alpha$ (infliximabe, adalimumabe, certolizumabe, golimumabe)		Bloqueio do TNF $\alpha$ livre e de seus receptores de membrana.
○ Anti-integrinas (vedolizumabe)		Bloqueio seletivo da integrina $\alpha 4\beta 7$ , inibindo o recrutamento celular na mucosa intestinal.
○ Anti-interleucina (ustequinumabe)	IL-12/23	Bloqueio da subunidade p40 presente nas interleucinas 12 e 23 (IL-12 e IL-23).
Inibidores da Janus quinase (tofacitinibe)		Molécula com ação sistêmica através do bloqueio da JAK 1 e 3, ocasionando uma diminuição na produção de citocinas pró-inflamatórias.

Legenda: DNA, ácido desoxirribonucleico; IL, interleucina; TNF- $\alpha$ , fator de necrose tumoral alfa; JAK, Janus Quinase

### 1.1.6 Índices de atividade clínica na doença inflamatória intestinal

O seguimento do paciente com DII inclui a avaliação clínica periódica e regular, considerando sempre os sintomas do paciente e a intensidade dos mesmos – essa análise é fundamental e auxilia a decisão terapêutica de introduzir, associar ou suspender determinado medicamento ou, até mesmo, a indicação de procedimentos cirúrgicos. Uma forma de realizar essa avaliação é com a utilização de escores clínicos de atividade para UC e DC, que devem, preferencialmente, ser de fácil aplicabilidade, de boa acurácia e de baixo custo.

Em pacientes com UC, o escore *Simple Clinical Colitis Activity Index* (SCCAI - Tabela 4) foi desenvolvido para avaliar a atividade clínica, sendo de fácil aplicabilidade na prática diária. Este leva em consideração seis critérios clínicos, são eles: frequência evacuatória diurna, frequência evacuatória noturna, urgência evacuatória, presença de sangramento nas fezes, percepção do estado geral e a presença de manifestações extraintestinais, que implicam em comprometimento da qualidade de vida do paciente com DII (22). Através da somatória dos pontos e da pontuação final, que pode variar de 0-19 pontos, considera-se como estando em remissão clínica aquele paciente que apresenta uma somatória  $\leq 2$  pontos (23). Um estudo recente demonstrou que durante o seguimento de 59 pacientes com UC, o escore SCCAI correlacionou-se com valores de hemoglobina, PCR, calprotectina fecal, índice de atividade endoscópica e com o risco de recaída da doença (24).

Tabela 4 – Escore de atividade clínica *Simple Clinical Colitis Activity Index (SCCAI)* para colite ulcerativa.

Sinais ou sintomas		Descrição	Pontuação
Frequência (diurna)	evacuatória	0-3	0
		4-6	1
		7-9	2
		>9	3
Frequência (noturna)	evacuatória	0	0
		1-3	1
		4-6	2
Urgência evacuatória		Nenhuma	0
		Presente*	1
		Urgente**	2
		Incontinência	3
Presença de sangue nas fezes		Nenhuma	0
		Traços	1
		Ocasionais (<50% das evacuações)	2
		Frequentes (>50% das evacuações)	3
Percepção de bem estar		Boa	0
		Ligeiramente abaixo do normal	1
		Ruim	2
		Muito ruim	3
		Péssimo	4
Manifestações extraintestinais (1 ponto para cada)		Artrite	1
		Uveíte	1
		Eritema nodoso	1
		Pioderma gangrenoso	1

\*Urgência evacuatória presente, mas não impede que o paciente exerça suas atividades de forma habitual.

\*\*Necessidade imediata de evacuar, porém, sem incontinência fecal.

O índice de Harvey-Bradshaw (IHB – Tabela 5) é uma ferramenta utilizada para avaliar a atividade clínica em pacientes com DC. Esta ferramenta utiliza parâmetros como percepção de bem estar, dor abdominal, número de evacuações líquidas ou pastosas nas últimas 24 horas, presença de massa abdominal e complicações da doença (25). Estudos demonstraram que o IHB apresenta uma boa correlação quando comparado com outro escore mais amplamente utilizado em ensaios clínicos, o *Crohn*

*Disease Activity Index* (CDAI), contudo, é de mais fácil aplicação na prática clínica. O IHB utiliza um valor  $\leq 4$  para classificar os pacientes como em remissão clínica (26, 27).

Tabela 5 – Índice de Harvey-Bradshaw para avaliação da atividade clínica na doença de Crohn.

Sinais e sintomas	Descrição	Pontuação
Percepção de bem estar	Boa	0
	Ligeiramente abaixo do normal	1
	Ruim	2
	Muito ruim	3
	Péssimo	4
Dor abdominal	Ausente	0
	Leve	1
	Moderada	2
	Acentuada	3
Número de evacuações líquidas ou pastosas (nas últimas 24 horas) – máximo de 25	Quantidade _____	_____
Massa abdominal	Ausente	0
	Duvidosa	1
	Presente	2
	Presente e dolorosa	3
Complicações extraintestinais (1 ponto por item)	Artralgia	
	Uveíte	
	Eritema nodoso	
	Úlcera aftoide oral	
	Pioderma gangrenoso	
	Fissura anal	
	Fístula nova	
Abscesso		

### 1.1.7 A proteína C reativa e seu papel na doença inflamatória intestinal

A utilização de marcadores inflamatórios na avaliação do paciente com DII consiste em uma abordagem comum e frequente na prática médica, tanto para auxiliar no diagnóstico quanto no seguimento dos pacientes. A PCR é um biomarcador inflamatório que foi descrito em 1930, sendo uma proteína de fase aguda produzida por hepatócitos, por meio do estímulo principal da interleucina-6 (IL-6), da interleucina-1 (IL-1) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (28, 29).

Diferentes estudos já foram conduzidos para avaliar o papel da PCR no seguimento e no auxílio das decisões terapêuticas nos pacientes com DII. Uma meta-análise publicada por Mosli *et al.* demonstrou que concentrações de PCR > 5 mg/L apresentam elevada especificidade para a presença de doença em atividade do ponto de vista endoscópico, mas uma baixa sensibilidade para tal (sensibilidade combinada de 0,49 (IC 95% 0.34 – 0.64) e especificidade de 0.92 (IC 95% 0.72 – 0.98) (30). Mais recentemente, Turner *et al.* consideraram que a normalização das concentrações de PCR deve ser um objetivo a médio prazo a ser alcançado com o tratamento dos pacientes com DII (31). Em um outro estudo foi observado que pacientes com DC e com concentrações séricas de infliximabe baixas (<1  $\mu$ g/mL) na 14<sup>o</sup> semana de tratamento apresentavam concentrações de PCR mais elevadas (> 0,5 mg/dL), quando comparados com pacientes com concentrações séricas de infliximabe mais elevadas ( $\geq$ 1  $\mu$ g/mL) (32). Em indivíduos com colite aguda grave, uma forma grave de apresentação da UC, valores mais elevados de PCR ( $\geq$  50 mg/L) na admissão foram um fator independente para risco de não resposta ao uso de corticosteroides (33).

## 1.2 PERMEABILIDADE INTESTINAL E ZONULINA

O sistema digestivo encontra-se em íntimo contato com o meio externo, estando exposto a nutrientes, água, microrganismos, toxinas, dentre outros substratos necessários para a manutenção da saúde, como também, prejudiciais ao organismo. A barreira intestinal é considerada um sistema complexo e dinâmico, composto pelos elementos luminiais, como por exemplo, ácido gástrico, secreção pancreática, imunoglobulinas, bactérias comensais, pela camada de muco, pela barreira epitelial e pelo sistema imunológico (34).

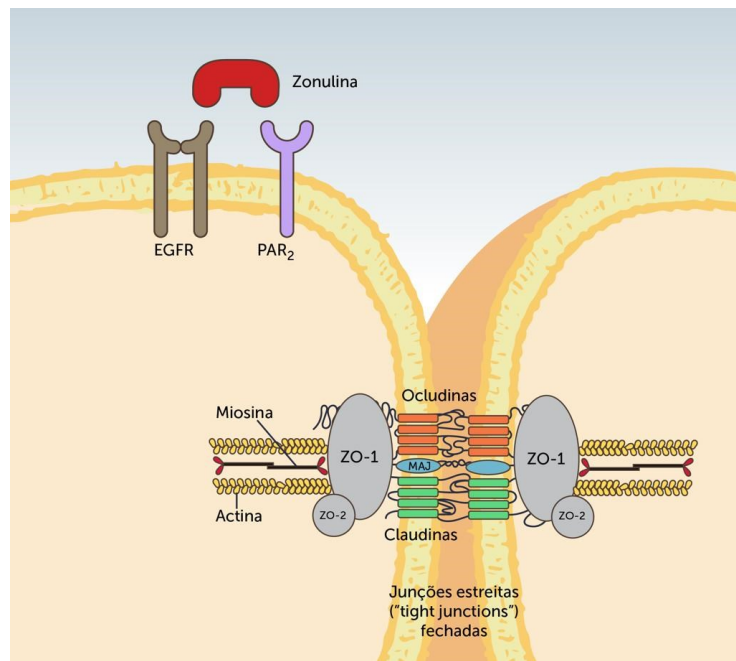


A barreira epitelial, constituída pela camada de células epiteliais intestinais, separa o microambiente externo das camadas mais profundas da mucosa do hospedeiro. Sendo assim, o lúmen intestinal, localizado próximo à região apical das células epiteliais e contendo uma variedade de macromoléculas, compostos bacterianos e anticorpos, permanece isolado de regiões mais internas do organismo, como por exemplo, a lâmina própria. Para que isso ocorra, é necessária que a barreira epitelial esteja íntegra; a integridade da barreira epitelial ocorre através da adesão celular que se faz presente através do complexo juncional, o qual é constituído pelas *tight junctions* (junções estreitas), pelas *adherens junctions* (junções aderenciais) e pelos desmossomos. Essas estruturas proteicas apresentam propriedades dinâmicas e influenciam a capacidade do epitélio intestinal de controlar a passagem de substratos através da via paracelular, sendo responsáveis, em parte, pela permeabilidade intestinal (35, 36).

A zonulina é uma proteína de 47-kDa de massa molecular, descrita por Wang *et al.*, que tem a capacidade de modular a permeabilidade intestinal. A sua identificação foi descrita por autores que investigaram a fisiopatologia da bactéria *Vibrio cholerae* e identificaram uma enterotoxina secundária, denominada de *zonula occludens toxin* (Zot) e seu homólogo endógeno, então denominado zonulina (37).

O mecanismo pelo qual a zonulina participaria da permeabilidade intestinal, influenciando-a, foi proposto por Fasano *et al.* Esse grupo propôs que a zonulina se ligaria ao receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), ativando-o; também, a zonulina teria a capacidade de ativar esse receptor através da ligação ao receptor tipo 2 ativado por protease (PAR<sub>2</sub>) (38). A ativação desses receptores culminaria em um processo de sinalização intracelular, o qual resultaria em uma diminuição da interação entre as proteínas das junções estreitas ("*tight junctions*"), que envolve a participação do citoesqueleto, e conseqüentemente, no desacoplamento da proteína ZO-1 e da ocludina do complexo juncional (39). As Figura 1 e 2 representam de forma esquemática essas estruturas e a influência da zonulina na permeabilidade intestinal.

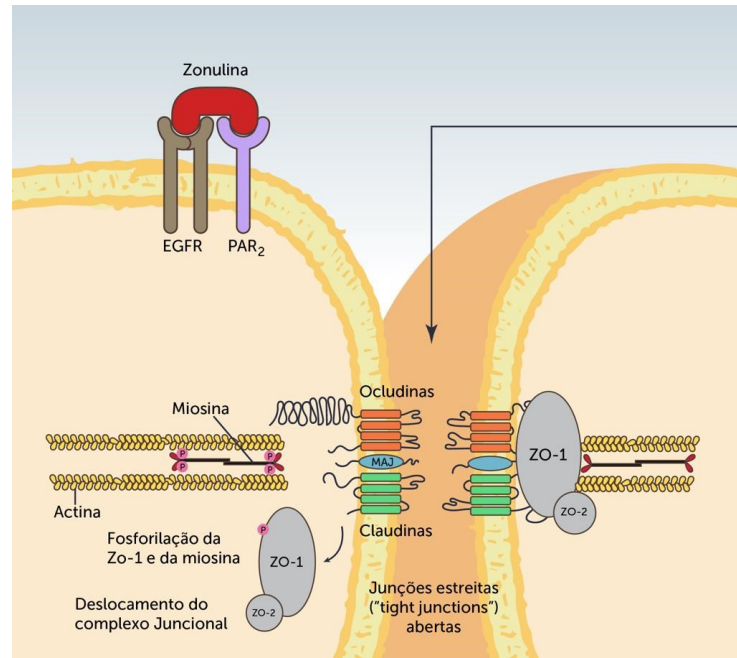
Figura 1 – Ilustração esquemática das junções estreitas (“tight junctions”) fechadas na ausência de ligação da zonulina aos receptores EGFR e PAR<sub>2</sub>.



Legenda: EGFR, receptor do fator de crescimento epidérmico; PAR<sub>2</sub>, receptor tipo 2 ativado por protease; MAJ, moléculas de adesão juncional; ZO-1, proteína *Zonula occludens-1*; ZO-2, proteína *Zonula occludens-2*.

Adaptado de Fasano, 2012.

Figura 2 – Ilustração esquemática das junções estreitas (“tight junctions”) abertas e do aumento da permeabilidade intestinal quando da ativação dos receptores EGFR pela ligação da zonulina aos mesmos ou quando da transativação destes EGFR<sub>s</sub> pela ligação da zonulina ao receptor PAR<sub>2</sub>.



Legenda: EGFR, receptor do fator de crescimento epidérmico; PAR<sub>2</sub>, receptor tipo 2 ativado por protease; MAJ, moléculas de adesão juncional; ZO-1, proteína *Zonula occludens-1*; ZO-2, proteína *Zonula-occludens 2*.

Adaptado de Fasano, 2012.

A avaliação da permeabilidade intestinal pode ser realizada através de diferentes métodos, sendo que o principal se faz por meio da ingestão de solutos com diferentes propriedades absorptivas e a sua dosagem posterior na urina. O principal teste utilizado em ensaios clínicos é o da razão de excreção lactulose/manitol, sendo este considerado um teste não invasivo, porém com dificuldades na sua realização devido à necessidade de jejum prolongado e à necessidade de coleta periódica de urina (40). Wyatt *et al.* demonstraram que indivíduos com diagnóstico de DC, ainda que em remissão clínica, apresentaram maior permeabilidade intestinal, avaliada por meio da razão lactulose/manitol, quando comparados com grupo controle, sendo também observado maior risco de recaída da doença dentro de um ano (41).

A participação da zonulina como um biomarcador com a capacidade de modular a permeabilidade intestinal já foi avaliada em diferentes doenças. Fasano *et al.* demonstraram uma maior expressão de zonulina em amostras teciduais de pacientes com doença celíaca quando comparados com grupo controle. Esse mesmo

grupo demonstrou um aumento da formação de autoanticorpos anti-zonulina no soro de indivíduos com doença celíaca em atividade em comparação com aqueles em remissão, inferindo, dessa forma, uma relação causal entre zonulina e aumento da permeabilidade intestinal (42). A correlação entre a zonulina e o aumento da permeabilidade intestinal foi avaliada previamente também em indivíduos com diabetes mellitus do tipo 1, tendo sido observado uma correlação direta entre o aumento da permeabilidade intestinal do teste lactulose/manitol e a concentração sérica da zonulina (43).

Outros estudos demonstraram uma possível associação entre o aumento da concentração sérica da zonulina com a permeabilidade intestinal. Caviglia *et al.* observaram que a concentração sérica de zonulina foi maior em indivíduos com DII em atividade clínica quando comparados com aqueles em remissão (44). Já em outro estudo de mesma autoria, foi avaliada a concentração sérica da zonulina em pacientes com DII e foi demonstrada uma concentração sérica mais elevada no grupo com DII quando comparado ao grupo controle (45).

### 1.3 O SISTEMA IMUNOLÓGICO E A PARTICIPAÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NA DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

Diversos estudos relacionados ao microambiente da resposta imunológica já foram conduzidos e contribuíram para uma melhor compreensão da fisiopatologia da DII. A perda da homeostase intestinal e o desequilíbrio da resposta imunológica presente na lâmina própria são importantes mecanismos envolvidos no desenvolvimento da DII (46).

O sistema imunológico pode ser dividido funcionalmente em inato e adaptativo. O sistema inato é representado, por exemplo, pelos neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, linfócitos *natural killer*, entre outras. Essas células expressam os chamados receptores de reconhecimento padrão, que se ligam a produtos microbianos ou antígenos externos e fornecem uma resposta inicial a microrganismos patogênicos ou comensais. O sistema adaptativo, por sua vez, é composto pelos linfócitos B e T, que conferem imunidade específica (47).

Tanto os mecanismos humorais quanto a resposta imune celular estão compreendidos na resposta imune adaptativa. A imunidade humoral é mediada pelos linfócitos B, que secretam anticorpos, como por exemplo, a classe A das

imunoglobulinas presentes em superfícies da mucosa (47). A imunidade celular é mediada pelos linfócitos T, que podem ser funcionalmente divididos em células T efetoras CD4+ (Th), células T CD8+ (citotóxicas) e células T regulatórias (Treg) (47, 48). As células T efetoras CD4+ diferenciam-se em subtipos celulares a partir da influência das características do microambiente e do perfil de secreção de suas citocinas. Exemplos incluem as células T *helper* 1 (Th1), T *helper* (Th2), T *helper* 9 (Th9), T *helper* 17 (Th17) e T *helper* 22 (Th22) (5, 48).

Enquanto as células Th1 secretam predominantemente interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral-alfa (TNF $\alpha$ ) e interleucina – 2 (IL-2), a resposta Th2 parece induzir uma maior produção de IL–4, IL–5 e IL–13. As células Th17 são uma linhagem de células T auxiliares que têm papel crítico na regulação do processo inflamatório e secretam principalmente IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22, e tem a sua expansão mediada pela IL-23 (48, 49).

A resposta Th1 foi descrita como predominante na DC e a resposta Th2 anormal relacionada à UC. Porém, devido a achados inconclusivos em outros estudos, a dicotomia entre Th1/Th2 parece, no momento, controversa. Ainda, ambas as doenças compartilham das mesmas opções terapêuticas (16, 21, 48). A importância da participação da via Th1 e Th17 na DII, principalmente na DC, é motivo de estudos, inclusive para o desenvolvimento de medicamentos com alvos terapêuticos que culminem com o bloqueio de citocinas inflamatórias relacionadas a essas vias (50).

Outros mecanismos, como a perda da imunotolerância, podem estar envolvidos no desequilíbrio entre a expressão de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. A IL-10 é uma citocina envolvida na modulação da resposta celular, podendo apresentar um papel importante na patogênese da DII, porém o seu papel como alvo terapêutico é ainda controverso (50, 51).

## 2 JUSTIFICATIVA

Uma melhor compreensão do papel da permeabilidade intestinal nas doenças imunomediadas, dentre elas, as doenças inflamatórias intestinais, se faz necessária. A investigação de um potencial biomarcador relacionado ao aumento da permeabilidade intestinal e a sua relação com a atividade clínica e com marcadores circulantes inflamatórios já bem estabelecidos, como a PCR, poderá trazer novas informações sobre a fisiopatologia da DII.

Até o presente momento, existem poucos estudos que avaliaram com consistência as concentrações da zonulina em pacientes com DII. O papel e a relevância da avaliação das concentrações da zonulina na condução e seguimento desses pacientes também ainda não estão bem estabelecidos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar as concentrações séricas da zonulina em pacientes portadores de DII e a sua correlação com índices clínicos de atividade da doença e com marcadores inflamatórios circulantes.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever as características demográficas e clínicas de uma amostra de pacientes com DII seguidos no ambulatório especializado do serviço de gastroenterologia do HU-UFSC.

- Comparar a concentração sérica da zonulina entre pacientes portadores de DII e grupo controle.

- Avaliar a concentração sérica da zonulina de acordo com o fenótipo da DII e também quanto às características demográficas, clínicas e índices de atividade clínica da DII.

- Investigar a correlação entre as concentrações séricas da zonulina, citocinas inflamatórias (TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4, IL-2) e PCR.

## 4 MÉTODOS

### 4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo está em conformidade com a resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196 de 10/10/1996. Os protocolos do presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-UFSC) e encontram-se registrados sob o nº 2.308.479 (Anexo A). O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) por escrito foi lido e assinado por todos os pacientes ou seus responsáveis (Anexo B).

### 4.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo observacional transversal.

### 4.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Foram considerados elegíveis os pacientes com diagnóstico de DC ou UC com idade igual ou superior a 18 anos e que estavam em seguimento regular no ambulatório de doença inflamatória intestinal do HU-UFSC. O diagnóstico de DII nesses pacientes já havia sido previamente confirmado pelos médicos especialistas em gastroenterologia que atuavam nesse serviço através da união de achados clínicos, laboratoriais, radiológicos, endoscópicos e histológicos.

Foram excluídos os indivíduos que se recusaram ou não compreenderam o TCLE, pacientes com histórico de internações hospitalares recentes (nos últimos 30 dias) não relacionadas a complicações da DII, pacientes com o antecedente de doença infecciosa aguda nos últimos 7 dias e pacientes portadores de neoplasias malignas.

O tamanho da amostra foi calculado em 116 pacientes, considerando a comparação da média das concentrações da zonulina em dois grupos independentes (DII em remissão clínica e laboratorial e DII em atividade clínica e laboratorial). Os seguintes parâmetros foram utilizados:

- $\alpha = 0,05$
- Poder do teste = 0,90



- Desvio-padrão = 5
- Diferença entre as médias = 3 ng/mL

Foram incluídos 117 pacientes com DII e 32 indivíduos saudáveis considerados como grupo controle, pareados por sexo e idade. O grupo controle foi constituído por estudantes, funcionários que desempenhavam suas funções no HU-UFSC e seus familiares, os quais foram convidados e aceitaram participar dessa pesquisa. Os critérios de exclusão do grupo controle foram: diagnóstico prévio de DII; impossibilidade de compreender o TCLE; internações hospitalares recentes (< 30 dias) por qualquer razão; doença infecciosa aguda nos últimos 7 dias; diagnóstico prévio ou em tratamento para neoplasias malignas; portadores de outra doença inflamatória crônica como por exemplo: lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide, espondilite anquilosante, doenças respiratórias (asma ou doença pulmonar obstrutiva crônica e psoríase) (Anexo E).

#### 4.4 PROCEDIMENTOS E VARIÁVEIS DO ESTUDO

##### 4.4.1 Procedimentos

Todos os pacientes elegíveis para o estudo foram abordados e convidados a participar da pesquisa após a sua consulta de rotina no ambulatório de DII. O TCLE foi aplicado e, após a sua assinatura, foi procedida a coleta de dados através de um instrumento próprio (Anexo C), realizado o exame físico e o paciente encaminhado para a Unidade de Laboratório de Análises Clínicas (ULAC) do HU-UFSC para realizar a coleta da amostra de sangue (Anexo D). Quando necessário, informações adicionais foram coletadas diretamente do prontuário médico. A coleta de dados e do material biológico foram realizadas no período entre abril de 2018 e outubro de 2019.

##### 4.4.2 Variáveis do estudo

- Variáveis clínicas e epidemiológicas:

Foram coletadas as variáveis idade, sexo, comorbidades, subtipo da DII (DC ou UC), tempo desde o diagnóstico, tratamento medicamentoso atual, tabagismo atual ou progresso, internações hospitalares prévias pela DII, antecedentes cirúrgicos relacionados à DII e o padrão de localização e comportamento da DII (classificação

de Montreal – Tabelas 1 e 2). Cada paciente foi submetido ao exame físico para a obtenção das variáveis peso, estatura, pressão arterial, frequência cardíaca, temperatura axilar e ao exame físico abdominal (com ênfase na palpação abdominal).

- Escores de atividade clínica na DII:

Após a anamnese e exame físico do paciente com DII, foi utilizado o instrumento de coleta contendo o escore clínico cabível para cada caso, o SCCAI para aqueles com diagnóstico de UC e o IHB para aqueles com diagnóstico de DC (Anexo C).

Os pacientes foram classificados entre os que estavam em remissão clínica ( $\text{SCCAI} \leq 2$  e  $\text{IHB} \leq 4$ ) e os que estavam em atividade clínica ( $\text{SCCAI} > 2$  e  $\text{IHB} > 4$ ). O escore de atividade SCCAI foi desenvolvido por Walmsley *et al.* e tem como vantagens a sua facilidade e rapidez na aplicação, apresentando uma boa correlação quando comparado com outro escore de atividade clínica que leva em consideração achados endoscópicos (22). O IHB também apresenta como ponto positivo a sua facilidade na aplicação, pois leva em consideração cinco parâmetros clínicos e, quando comparado com outro escore de atividade mais complexo e de difícil aplicação, também demonstrou uma boa correlação (26).

- Variáveis laboratoriais:

Todos os indivíduos foram submetidos à coleta de sangue periférico logo após a avaliação clínica utilizando um pedido médico exclusivo que contemplava todos os parâmetros laboratoriais necessários para esta pesquisa. Ainda, foram armazenadas amostras de soro de cada paciente a  $- 80^{\circ}$  C para dosagem posterior das concentrações da zonulina e das citocinas inflamatórias (TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4, IL-2).

- Exames de rotina:

Os exames laboratoriais de rotina foram realizados pela ULAC do HU-UFSC. Os parâmetros bioquímicos aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamiltransferase (GGT), fosfatase alcalina (FA) e albumina foram determinados pelo analisador automático Dimension RxL Max® (Siemens). O hemograma foi avaliado pelo analisador hematológico XE-2100® (Sysmex).

- Proteína C Reativa (PCR):

A concentração da PCR foi determinada pelo analisador automático Dimension RxL Max® (Siemens), com sensibilidade analítica de 0,5 mg/L, de acordo com o fabricante.

- Citocinas inflamatórias:

As dosagens das citocinas (TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4, IL-2) foram realizadas pelo método de citometria de fluxo (CBA - *Cytometric Bead Array*) da marca BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit, através do equipamento BD FACSVerse, conforme as orientações do fabricante. Os resultados foram expressos em pg/mL e analisados através do software FCAP Array v3. Os valores mínimos de detecção fornecidos pelo fabricante foram de 18,9 pg/mL para IL-17A, 4,5 pg/mL para IL-10, 2,4 pg/mL para IL-6, 4,9 pg/mL para IL-4, 2,6 pg/mL para IL-2, 3,8 pg/mL para TNF e 3,7 pg/mL para INF- $\gamma$ .

- Zonulina sérica:

A avaliação das concentrações da zonulina foi realizada ULAC do HU-UFSC, pela farmacêutica-bioquímica Camila Matiollo, através do método ELISA sanduíche da marca Elabscience® (E-EL-H5560). As amostras de soro recém descongeladas foram diluídas cinco vezes e dosadas conforme as orientações do fabricante. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm. Para a análise dos dados, foi utilizada uma regressão logística de quatro parâmetros de um software *online* disponível em [www.myassays.com](http://www.myassays.com). Os resultados foram expressos em ng/mL. A faixa de detecção fornecida pelo fabricante foi de 0,78 a 50 ng/mL e a sensibilidade foi de 0,47 ng/mL.

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis foram descritas como medidas de tendência central e dispersão, no caso de variáveis contínuas. As variáveis categóricas foram descritas em números absolutos e proporções. As variáveis contínuas foram comparadas através dos testes *t* de Student ou Mann-Whitney, quando apropriado. As variáveis categóricas foram avaliadas pelo teste do qui-quadrado. O coeficiente de correlação de Pearson ou Spearman foi utilizado para avaliar a presença de correlação entre as variáveis contínuas. Valores de *p* menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Todos os testes utilizados foram bicaudais e executados pelo programa estatístico SPSS, versão 17.0 (SPSS, Chicago, IL, EUA).

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Características da casuística**

Foram incluídos 117 pacientes com diagnóstico prévio de DII em acompanhamento ambulatorial e 32 indivíduos saudáveis, os quais constituíram o grupo controle. A Tabela 6 demonstra as principais características dos pacientes.

Tabela 6 - Características da casuística (pacientes com doença inflamatória intestinal; n = 117).

<b>Variável</b>	<b>Pacientes (n=117)</b>
Idade (anos), média ± DP	44,0 ± 15,9
Sexo feminino, n (%)	78 (66,7)
Diagnóstico, n (%)	
Colite ulcerativa	57 (48,7)
Doença de Crohn	60 (51,3)
Tempo desde o diagnóstico (anos), mediana	7,0
Comorbidades	
Hipertensão arterial sistêmica, n (%)	27 (23,1)
Dislipidemia, n (%)	18 (15,4)
Depressão, n (%)	14 (12,0)
Doença do metabolismo ósseo, n (%)	12 (10,3)
Diabetes Mellitus, n (%)	10 (8,5)
Colangite esclerosante primária, n (%)	3 (2,6)
Consumo ativo de álcool, n (%)	36 (30,8)
Tabagismo atual, n (%)	5 (4,3)
Tabagismo prévio, n (%)	46 (39,3)
Cirurgia prévia, n (%)	19 (16,2)
IMC, média ± DP	26,7 ± 5,6
Exames laboratoriais	
Hemoglobina (mg/dL), mediana	13,1
Hematócrito (%), mediana	39,6
PCR (mg/dL), mediana	3,2
Albumina (g/dL), mediana	3,8
Zonulina (ng/mL), mediana	95,28
TNF (pg/mL), mediana	6,17
IFN-γ (pg/mL), mediana	14,53
IL-17A (pg/mL), mediana	26,38
IL-10 (pg/mL), mediana	7,44
IL-6 (pg/mL), mediana	7,70
IL-4 (pg/mL), mediana	15,74
IL-2 (pg/mL), mediana	10,32

Legenda: DP, desvio-padrão, IMC, índice de massa corporal; PCR, proteína C reativa; TNF, fator de necrose tumoral; IFN-γ, interferon gama; IL-17A, interleucina 17A; IL-10, interleucina 10; IL-6, interleucina 6; IL-4, interleucina 4; IL-2, interleucina 2.

No grupo de casos a média de idade foi de  $44,0 \pm 15,9$  anos, sendo observada uma predominância do sexo feminino (66,7%). Em relação ao diagnóstico estabelecido, 60 (51,3%) pacientes eram portadores de DC e apresentavam uma mediana de tempo desde o diagnóstico de 7,0 anos. Quando avaliadas as comorbidades, 23,1% dos pacientes possuíam o diagnóstico e estavam em tratamento para hipertensão arterial sistêmica, 15,4% para dislipidemia, 12% para transtorno depressivo, 10% para doenças do metabolismo ósseo (osteopenia ou osteoporose) e 8,5% para diabetes mellitus. A colangite esclerosante primária foi observada em 2,6% dos pacientes com DII. Em relação ao consumo ativo de álcool e tabagismo atual, 30,8% afirmaram o consumo de qualquer quantidade de álcool nos últimos 30 dias, 4,3% relatavam fumar ativamente e 39,3% relataram que já fumaram previamente. Dos 117 pacientes, 16,2% haviam sido submetidos à alguma intervenção cirúrgica devido a complicações da DII. A média do IMC foi de  $26,7 \pm 5,6$ .

Quando analisados os resultados laboratoriais, foi observada uma mediana de 13,1 g/dL de hemoglobina, 39,6 % de hematócrito, 3,2 mg/L de PCR e 3,8 g/dL de albumina. A análise da concentração da zonulina sérica demonstrou uma mediana de 95,28 ng/mL. Em relação aos valores da mediana encontrados para as dosagens de TNF, IFN- $\gamma$  e interleucinas (IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4, IL-2), os resultados foram de 6,17 pg/mL para TNF, 14,53 pg/mL para IFN- $\gamma$ , 26,38 pg/mL para IL-17A, 7,44 pg/mL para IL-10, 7,70 pg/mL para IL-6, 15,74 pg/mL para IL-4 e 10,32 pg/mL para IL-2.

A Tabela 7 demonstra as principais características clínicas relacionadas ao diagnóstico de DC e de UC. Em relação à DC, a localização mais comum do acometimento foi o íleo terminal (33% dos casos diagnosticados). O padrão ou fenótipo da doença mais observado foi o inflamatório, apresentado por 45% dos pacientes. Quando avaliada a presença ou não de atividade clínica através do IHB, mais da metade dos pacientes (56,7%) com DC estavam em remissão clínica, definida como  $IHB \leq 4$ . Em relação à UC, o padrão de acometimento mais encontrado foi o de pancolite ou colite extensa (57,1% dos casos). Quanto à avaliação da atividade da doença nos pacientes com UC, 77,2% deles encontravam-se em remissão clínica ( $\leq 3$  evacuações diárias e ausência de sangue nas fezes); quando aplicado o escore de atividade *Simple Clinical Colitis Activity Index* (SCCAI), 59,2% dos pacientes foram classificados como encontrando-se em remissão clínica.

Tabela 7 – Descrição das características intrínsecas à doença nos pacientes com doença de Crohn (n=60) e naqueles com colite ulcerativa (n=57).

<b>Diagnóstico</b>	<b>Pacientes</b>
Doença de Crohn	(n=60)
Localização	
L1 – Íleo terminal, n (%)	20 (33)
L2 – Cólon, n (%)	18 (30)
L3 – Ileocolônica, n (%)	16 (26,7)
L4 - Acometimento do trato superior	6 (10)
Comportamento	
B1 – Inflamatório, n (%)	27 (45)
B2 – Estenosante, n (%)	18 (30)
B3 – Penetrante, n (%)	15 (25)
p – Doença perianal associada, n (%)	13 (21,7)
Atividade da doença	
IHB ≤ 4 (remissão clínica), n (%)	34 (56,6)
IHB > 4 (atividade clínica), n (%)	26 (43,7)
Colite ulcerativa	(n= 57)
Extensão do acometimento	
E1 – Proctite, n (%)	8 (16,1)
E2 – Colite esquerda, n (%)	15 (26,8)
E3 – Pancolite ou colite extensa, n (%)	32 (57,1)
Sem informações, n (%)	2 (3,5)
Atividade da doença	
Remissão (≤ 3 evacuações ao dia e ausência de sangue nas fezes), n (%)	44 (77,2)
Atividade (> 3 evacuações ao dia e presença de sangue nas fezes), n (%)	13 (22,8)
SCCAI ≤ 2 (remissão clínica), n (%)	34 (59,6)
SCCAI > 2 (atividade clínica), n (%)	23 (40,4)

Legenda: IHB, índice de Harvey-Bradshaw; SCCAI, *Simple Clinical Colitis Activity Index*.

O tratamento medicamentoso realizado pelos pacientes com DII está descrito na Tabela 8. Quarenta e seis por cento dos pacientes estavam em uso de mesalazina, 14,5% estavam em uso de corticoesteroides, 50,4% de azatioprina, 28,2% de algum imunobiológico, dentre os mais utilizados, o infliximabe em 15,4% dos pacientes,

seguido pelo adalimumabe em 10,3% deles. A frequência da utilização de outros imunobiológicos foi de um paciente para o certolizumabe, um paciente para o ustequinumabe e um paciente para o vedolizumabe. A suplementação de ferro via oral e endovenosa foi necessária em 13,7% dos casos.

Tabela 8 – Frequência dos tratamentos realizados pelos pacientes com doença inflamatória intestinal.

<b>Medicamento</b>	<b>Pacientes (n=117)</b>
Sulfassalazina, n (%)	21 (17,9)
Mesalazina, n (%)	54 (46,2)
Corticoide, n (%)	17 (14,5)
Azatioprina, n (%)	59 (50,4)
Imunobiológicos (anti-TNF $\alpha$ , anti-integrina, anti-IL-12/23), n (%)	33 (28,2)
Infliximabe, n (%)	18 (15,4)
Adalimumabe, n (%)	12 (10,3)
Certolizumabe, n (%)	01 (0,9)
Vedolizumabe, n (%)	01 (0,9)
Ustequinumabe, n (%)	01 (0,9)
Suplementação de ferro, n (%)	17 (14,5)

## 5.2 Análise comparativa da idade e dos parâmetros laboratoriais entre os pacientes com doença inflamatória intestinal e os indivíduos do grupo controle

Foram comparados os dados dos 117 indivíduos com diagnóstico de DII com os 32 indivíduos saudáveis (Tabela 9). Quando comparados os dois grupos, observamos que não houve diferença entre a média da idade ( $p = 0,698$ ). Em relação às medianas dos valores de hemoglobina, hematócrito, leucometria e contagem de plaquetas, também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p = 0,891$ ;  $p = 0,425$ ;  $p = 0,656$  e  $p = 0,081$ , respectivamente). Em relação às concentrações séricas da PCR, observou-se que, entre os indivíduos com DII, a mediana foi de 3,2 mg/dL e, no grupo controle, a mediana foi de 1,0 mg/dL ( $p < 0,001$ ). A mediana dos valores de albumina, outro marcador indireto de gravidade, foi de 3,8



g/dL no grupo DII e de 3,9 mg/dL no grupo controle ( $p = 0,113$ ). Quando comparados os valores de AST, ALT, GGT e FA, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos ( $p = 0,588$ ;  $p = 0,774$ ;  $p = 0,164$  e  $p = 0,062$ , respectivamente).

Tabela 9 – Comparação da idade e dos parâmetros laboratoriais entre os pacientes com doença inflamatória intestinal (n=117) e os indivíduos do grupo controle (n=32).

Variável	DII (n=117)	Controle (n=32)	p
Idade (anos), média ± DP	44,0 ± 15,8	42,6 ± 14,6	0,698
Hemoglobina (mg/dL), mediana	13,1	13,0	0,891
Hematócrito (%), mediana	39,6	38,6	0,425
Leucócitos (cél/mm <sup>3</sup> ), mediana	6760,0	7070,0	0,656
Plaquetas (cél/mm <sup>3</sup> ), mediana	249000,0	233000,0	0,081
PCR (mg/L), mediana	3,2	1,0	<0,001
Albumina (g/dL), mediana	3,8	3,9	0,113
AST (U/L), mediana	19,0	20,0	0,588
ALT (U/L), mediana	25,0	24,0	0,774
GGT (U/L), mediana	32,0	27,0	0,164
FA (U/L), mediana	74,0	64,5	0,062

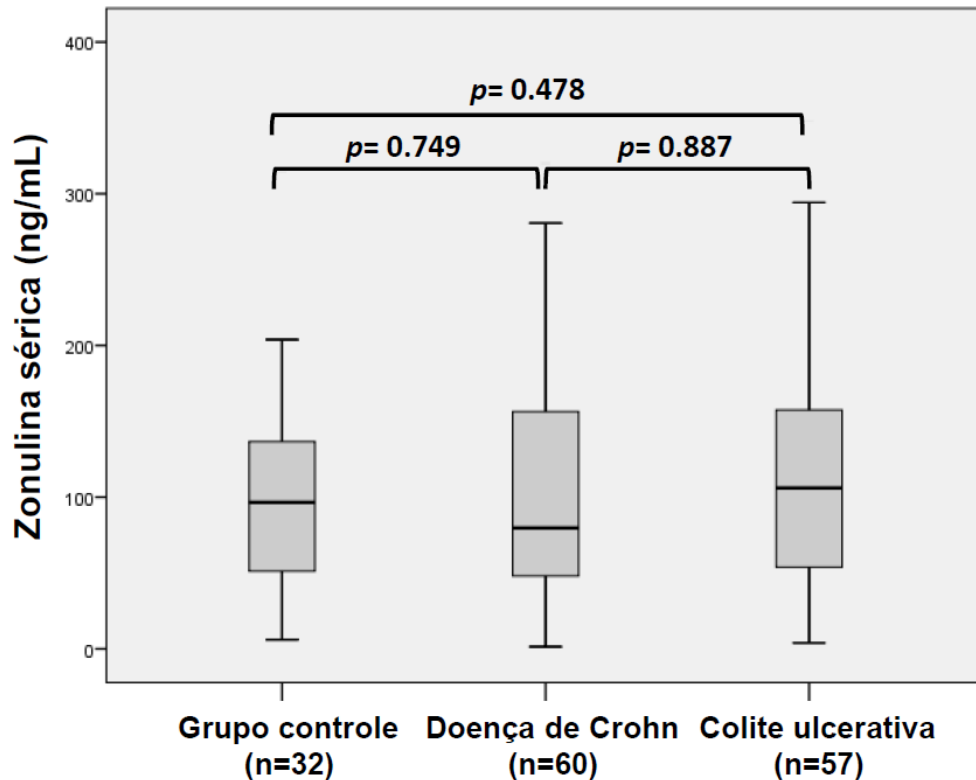
Legenda: DP, desvio-padrão; PCR, proteína C reativa; AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina aminotransferase; GGT, gamaglutamiltransferase; FA, fosfatase alcalina.

### 5.3 A concentração sérica da zonulina como marcador de permeabilidade intestinal

#### 5.3.1 A concentração sérica da zonulina e a sua comparação entre os pacientes com doença inflamatória intestinal e o grupo controle

A concentração sérica da zonulina foi avaliada nos 117 pacientes com DII e nos 32 indivíduos do grupo controle. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos. Observou-se que, no grupo DII, a mediana da concentração sérica da zonulina foi de 95,28 ng/mL e, no grupo controle, a mesma foi de 96,61 ng/mL ( $p = 0,573$ ) (Figura 3).

Figura 3 – Concentração sérica da zonulina em pacientes com doença inflamatória intestinal (n=117) e nos indivíduos do grupo controle (n=32).



### 5.3.2 A concentração sérica da zonulina como marcador de permeabilidade intestinal em pacientes com doença inflamatória intestinal

Como observado na Tabela 10, quando analisada a concentração sérica da zonulina somente em indivíduos com DII, observou-se que pacientes do sexo feminino apresentaram valores mais elevados do que pacientes do sexo masculino, com mediana de 126,05 ng/mL *versus* 46,65 ng/mL ( $p < 0,001$ ). A mediana da concentração da zonulina em pacientes com doença de Crohn foi de 79,68 ng/mL e, nos pacientes com colite ulcerativa, foi de 106,10 ng/mL, não sendo observada diferença estatisticamente significativa entre estes dois espectros da DII nesta casuística ( $p = 0,887$ ). Da mesma forma, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a concentração sérica da zonulina nos pacientes com DII submetidos a procedimentos cirúrgicos ou internações hospitalares prévias devido a alguma complicação da doença em relação aos que não tiveram nenhum procedimento cirúrgico ou internações prévias ( $p = 0,118$  e  $p = 0,814$ , respectivamente).

Tabela 10 – Descrição da concentração sérica da zonulina nos pacientes com doença inflamatória intestinal de acordo com as variáveis sexo, diagnóstico, procedimento cirúrgico prévio e internação hospitalar prévia.

Variável	Zonulina ng/mL, mediana	<i>p</i>
Sexo		<0,001
Feminino	126,05	
Masculino	46,65	
Diagnóstico		0,887
Doença de Crohn	79,68	
Colite ulcerativa	106,10	
Procedimento cirúrgico prévio		0,118
Sim	66,62	
Não	106,95	
Internação hospitalar prévia		0,814
Sim	90,03	
Não	97,63	

### 5.3.3 Análise da correlação entre a concentração sérica da zonulina e variáveis como a idade, índice de massa corporal, escores de atividade clínica da doença e parâmetros laboratoriais em pacientes com doença inflamatória intestinal

Foram realizadas análises de correlação de Spearman entre a concentração sérica da zonulina e variáveis demográficas, clínicas e laboratoriais em pacientes com DII (Tabela 11). A idade apresentou uma correlação positiva fraca com a concentração da zonulina ( $r_s = 0,184$ ;  $p = 0,047$ ). O IMC foi avaliado em 114 pacientes com DII, sendo observada uma correlação positiva moderada com a concentração da zonulina ( $r_s = 0,573$ ;  $p < 0,001$ ). A concentração de hemoglobina e hematócrito apresentaram uma correlação negativa fraca com a concentração da zonulina ( $r_s = -0,254$ ;  $p = 0,006$  e  $r_s = 0,252$ ;  $p = 0,006$ , respectivamente). As concentrações séricas da PCR e albumina não apresentam correlação com as da zonulina.

Tabela 11 – Correlação entre a concentração sérica da zonulina e as variáveis idade, índice de massa corporal, escores de atividade clínica e parâmetros laboratoriais em pacientes com doença inflamatória intestinal.

Variável	DII (n=117)		UC (n=57)		DC (n=60)	
	Zonulina		Zonulina		Zonulina	
	$r_s$	$p$	$r_s$	$p$	$r_s$	$p$
Idade	0,184	0,047	--	--	--	--
IMC	0,573	< 0,001	--	--	--	--
SCCAI	--	--	0,271	0,041	--	--
IHB	--	--	--	--	0,108	0,412
Hemoglobina	-0,254	0,006	-0,289	0,029	-0,223	0,087
Hematócrito	-0,252	0,006	-0,299	0,024	-0,227	0,081
PCR	0,142	0,126	0,299	0,024	0,016	0,903
Albumina	-0,179	0,054	-0,344	0,009	-0,042	0,750

Legenda: DII, doença inflamatória intestinal; UC, colite ulcerativa; DC, doença de Crohn; IMC, índice de massa corporal; SCCAI, *Simple Clinical Colitis Activity Index*; IHB, índice de Harvey-Bradshaw; PCR, proteína C reativa.

Em relação aos 57 pacientes com UC, a concentração sérica da zonulina apresentou uma correlação negativa fraca com valores de hemoglobina, hematócrito e albumina ( $r_s = -0,289$ ;  $p = 0,299$ ,  $r_s = -0,0299$ ;  $p = 0,024$  e  $r_s = -0,344$ ;  $p = 0,009$ , respectivamente). Quando analisada a concentração da zonulina e o índice de atividade clínica SCCAI, observou-se uma correlação positiva fraca, porém estatisticamente significativa ( $r_s = 0,271$ ;  $p = 0,041$ ).

Foram analisados isoladamente os 60 pacientes com diagnóstico de DC e não foram observadas correlações estatisticamente significativas entre a concentração da zonulina e valores de hemoglobina, hematócrito, PCR, albumina e o índice de atividade clínica de Harvey-Bradshaw.

#### **5.3.4 Análise da concentração da zonulina sérica, proteína C reativa e albumina e comparação das mesmas com características clínicas, escore de atividade clínica (índice de Harvey-Bradshaw) e comportamento da doença em pacientes com doença de Crohn**

Foram realizadas comparações da concentração sérica da zonulina, PCR e albumina com características clínicas dos pacientes com DC. As Tabelas 12 e 13

resumem estes achados. Quando avaliados isoladamente, dentre os 60 pacientes com diagnóstico de doença de Crohn, 37 (65%) eram do sexo feminino, sendo que a concentração sérica de zonulina nesse grupo foi maior quando comparados ao sexo masculino, com mediana de 128,10 ng/mL e 47,22 ng/mL, respectivamente ( $p < 0,001$ ). O valor da PCR foi semelhante em ambos os sexos, com uma mediana de 4,1 mg/L para o sexo feminino e 2,7 mg/L para o sexo masculino ( $p = 0,938$ ). A concentração de albumina também não apresentou diferença significativa, sendo a mediana no sexo feminino de 3,8 g/dL e, de 3,9 g/dL no sexo masculino ( $p = 0,478$ ).

A presença de tabagismo ativo foi observada em apenas 2 (3,3%) dos indivíduos com DC e não influenciou de forma significativa nos valores séricos da zonulina, PCR e albumina quando comparados com indivíduos sem tabagismo ativo. A história de tabagismo pregresso foi observada em 23 (38,3%) indivíduos com DC. A mediana da concentração de zonulina nesse grupo foi de 118,40 ng/mL, sendo que nos indivíduos sem histórico de tabagismo pregresso esta concentração foi de 73,63 ( $p = 0,099$ ). Não foram observadas diferenças estatísticas quando avaliadas as concentrações da PCR e albumina entre os dois grupos.

Quando avaliado o índice de atividade clínica através do escore de Harvey-Bradshaw, foi observado que 34 (56,6%) pacientes com DC estavam em remissão clínica ( $IHB \leq 4$ ) e 26 (43,3%) apresentavam atividade clínica no momento da avaliação ( $IHB > 4$ ). A mediana da concentração sérica da zonulina no grupo com atividade clínica foi de 105,54 ng/mL, sendo que, no grupo em remissão clínica, o valor encontrado foi de 73,11 ng/mL ( $p = 0,602$ ). O valor da PCR foi de 5,5 mg/L no grupo com atividade clínica; no grupo com remissão clínica o valor encontrado foi de 2,8 mg/L ( $p = 0,077$ ). Quando avaliada a concentração de albumina, o grupo com atividade clínica apresentou uma concentração de albumina igual ao grupo com remissão – a mediana dos valores foram 3,8 g/dL ( $p = 0,230$ ).

Quando avaliado o comportamento da doença de Crohn, foi observado que a mediana da concentração da zonulina no grupo com doença de componente predominantemente inflamatório (B1) foi de 84,14 ng/mL, no grupo com doença estenosante (B2) de 72,24 ng/mL e no grupo com doença penetrante (B3) a concentração encontrada foi de 127,10 ng/mL ( $p = 0,974$ ). O valor de PCR foi de 6,4 mg/L no grupo B1, 2,9 mg/L no grupo B2 e de 2,5 mg/L no grupo B3 ( $p = 0,059$ ). Quando avaliada a concentração de albumina, observou-se uma mediana igual nos três grupos de 3,8 g/dL ( $p = 0,809$ ).

Em relação ao histórico de internações hospitalares nos indivíduos com DC, 41 (68,3%) deles apresentaram o antecedente de internação hospitalar devido à alguma complicação da DII. A concentração da zonulina nesse grupo foi de 72,60 ng/mL, sendo que, no grupo sem internações prévias, esta foi de 127,10 ng/mL ( $p = 0,071$ ). Quando analisada a concentração da PCR na população que foi submetida a alguma internação hospitalar, o resultado encontrado foi de 2,7 mg/L, sendo que no grupo sem internação prévia, este foi de 6,1 mg/L ( $p = 0,053$ ). A albumina apresentou resultados iguais em ambos os grupos, com uma mediana igual a 3,8 g/dl ( $p = 0,804$ ).

Dos 60 pacientes com DC, 19 (31,6%) deles foram submetidos a algum procedimento cirúrgico. A mediana da concentração da zonulina neste grupo foi de 111,00 ng/mL, sendo que na população sem histórico de cirurgias prévias a mesma foi de 66,62 ng/mL ( $p = 0,114$ ). A concentração da PCR e albumina nos pacientes que foram submetidos a algum procedimento cirúrgico no passado foi de 2,0 mg/L e 3,8 g/dL, respectivamente, não sendo observada diferença estatística quando estas foram comparadas com a de indivíduos sem procedimentos cirúrgicos prévios (4,7 mg/L ( $p = 0,089$ ) e 3,8 g/dL ( $p = 0,749$ ), respectivamente).

Tabela 12 – Avaliação da concentração sérica da zonulina nos pacientes com doença de Crohn em relação às características clínicas, atividade da doença (índice de Harvey-Bradshaw) e comportamento da doença.

<b>Variável</b>	<b>Zonulina ng/mL, mediana</b>	<b>p</b>
Sexo		<0,001
Feminino	128,10	
Masculino	47,22	
Tabagismo ativo		0,651
Não	89,71	
Sim	69,74	
Tabagismo pregresso		0,099
Não	73,63	
Sim	118,40	
Atividade da doença		0,602
Remissão (IHB ≤ 4)	73,11	
Atividade (IHB > 4)	105,54	
Comportamento		0,974
Inflamatório (B1)	84,14	
Estenosante (B2)	72,24	
Penetrante (B3)	127,10	
Internação hospitalar prévia		0,071
Não	127,10	
Sim	72,60	
Procedimento cirúrgico prévio		0,114
Não	66,62	
Sim	111,00	

Legenda: IHB, índice de Harvey-Bradshaw.

Tabela 13 – Avaliação da concentração sérica da proteína C reativa e da albumina nos pacientes com doença de Crohn em relação às características clínicas, atividade da doença (índice de Harvey-Bradshaw) e comportamento da doença.

Variável	PCR mg/L, mediana	<i>p</i>	Albumina g/dL, mediana	<i>p</i>
Sexo		0,938		0,478
Feminino	4,1		3,8	
Masculino	2,7		3,9	
Tabagismo ativo		0,422		0,147
Não	3,4		3,8	
Sim	2,9		3,8	
Tabagismo progressivo		0,201		0,261
Não	3,0		3,9	
Sim	4,7		3,8	
Atividade da doença		0,077		0,230
Remissão (IHB ≤ 4)	2,8		3,8	
Atividade (IHB > 4)	5,5		3,8	
Comportamento		0,059		0,809
Inflamatório (B1)	6,4		3,8	
Estenosante (B2)	2,9		3,8	
Penetrante (B3)	2,5		3,8	
Internação hospitalar prévia		0,053		0,804
Não	6,1		3,8	
Sim	2,7		3,8	
Procedimento cirúrgico prévio		0,089		0,749
Não	4,7		3,8	
Sim	2,0		3,8	

Legenda: PCR, proteína C reativa; IHB, índice de Harvey-Bradshaw.

### 5.3.5 Análise da concentração da zonulina sérica, proteína C reativa e albumina e comparação das mesmas com características clínicas, escore de atividade clínica (*Simple Clinical Colitis Activity Index*) e extensão do acometimento da doença em pacientes com colite ulcerativa

Foram realizadas comparações da concentração sérica da zonulina, PCR e albumina com características clínicas de pacientes com UC. As Tabelas 14 e 15



resumem estes achados. Dos 57 pacientes com diagnóstico de UC, 39 (68,4%) eram do sexo feminino, sendo que a mediana da concentração da zonulina foi também maior quando comparado ao sexo masculino, 115,60 ng/mL e 43,05 ng/mL, respectivamente ( $p < 0,001$ ). Quando avaliada a mediana do valor de PCR, não foi observada diferença estatística entre os sexos, sendo que no sexo feminino este resultado foi de 3,2 mg/L e, no masculino, de 2,2 mg/L ( $p = 0,559$ ). A concentração da albumina apresentou diferença estatística, sendo a mediana no sexo feminino de 3,8 g/dL e de 4,0 g/dL no sexo masculino ( $p = 0,025$ ).

A presença de tabagismo ativo foi observada em apenas 3 (5,2%) dos indivíduos com UC e não acarretou diferença significativa nos valores séricos da zonulina, PCR e albumina quando estes foram comparados com os indivíduos que nunca fumaram.

Quando avaliada a presença de tabagismo pregresso, foi observado que 23 (40,3%) pacientes já haviam adotado a prática do tabagismo em algum momento de suas vidas. A mediana da concentração de zonulina no grupo com tabagismo pregresso foi de 84,79 ng/mL, e de 106,95 ng/mL no grupo que nunca fumou ( $p = 0,974$ ). A mediana da concentração da PCR também foi semelhante entre os grupos, sendo de 2,6 mg/L no grupo com histórico pregresso de tabagismo e de 2,9 mg/L no grupo que nunca fumou ( $p = 0,745$ ). A concentração da albumina foi igual entre os dois grupos, com valor de 3,9 g/dL ( $p = 0,831$ ).

Quando avaliada a atividade clínica através das recomendações da ECCO (remissão clínica definida por um número de evacuações diárias menor ou igual a 3 e pela ausência de sangramento nas fezes), observou-se que 44 (77,1%) indivíduos estavam em remissão, sendo a mediana da concentração da zonulina de 89,73 ng/mL, já naqueles com critérios para atividade clínica, a concentração da zonulina foi de 167,90 ng/mL ( $p = 0,110$ ). Quando avaliada a concentração da PCR, observou-se que no grupo em remissão clínica o valor foi de 2,9 mg/L, e no grupo em atividade esta foi de 2,6 mg/L ( $p = 0,493$ ). A concentração da albumina foi de 3,9 g/dL nos indivíduos em remissão clínica e de 4,0 g/dL com atividade clínica no momento da avaliação ( $p = 0,259$ ).

Em outra análise, utilizando o escore SCCAI (*Simple Clinical Colitis Activity Index*), e considerando remissão clínica uma pontuação menor e igual a 2 pontos, verificou-se que 34 (59,6%) estavam em remissão clínica no momento da avaliação. A mediana da concentração da zonulina encontrada neste grupo foi de 85,58 ng/mL,

sendo que no grupo com atividade clínica a mediana encontrada foi de 125,50 ng/mL ( $p = 0,068$ ). A concentração da PCR no grupo em remissão clínica foi de 3,2 mg/L e, no grupo em atividade clínica, esta foi de 2,6 mg/L ( $p = 0,871$ ). A mediana da concentração de albumina foi igual entre os grupos, tendo sido de 3,9 g/dL ( $p = 0,589$ ).

A avaliação da extensão do acometimento em pacientes com UC foi considerada para a análise da concentração da zonulina, PCR e albumina. Ao todo foram obtidos os dados de 55 pacientes com UC, sendo a colite extensa (E3) a mais frequentemente encontrada com o total de 32 (58,1%) pacientes. A mediana da concentração da zonulina foi de 114,90 ng/mL nos indivíduos com proctite (E1), 106,10 ng/mL na colite esquerda (E2) e de 89,73 ng/mL na colite extensa (E3) ( $p = 0,888$ ). A mediana da concentração da PCR encontrada foi de 2,9 mg/L no grupo E1, 2,6 mg/L no grupo E2 e 2,9 mg/L no grupo E3 ( $p = 0,967$ ). Quando avaliada a concentração de albumina, o grupo E1 apresentou uma mediana de 3,8 g/dL, o grupo E2 de 3,9 g/dL e o grupo E3 de 4,0 g/dL ( $p = 0,824$ ).

Em relação aos pacientes com UC, 27 (47,3%), deles apresentaram história de internação hospitalar decorrente de alguma complicação da DII. Quando avaliada a concentração da zonulina, foi observado que, no grupo com internação prévia, a mediana foi de 112,70 ng/mL e, no grupo sem internação prévia, esta foi de 74,21 ng/mL ( $p = 0,096$ ). A concentração da PCR foi de 2,7 e 2,6 mg/L, no grupo com e sem internações prévias, respectivamente ( $p = 0,388$ ). O valor da concentração de albumina encontrado foi de 3,8 g/dL naqueles com internação prévia e de 3,9 g/dL naqueles sem internações prévias ( $p = 0,464$ ).

Tabela 14 – Avaliação da concentração sérica da zonulina nos pacientes com colite ulcerativa em relação às características clínicas, atividade da doença e extensão do acometimento.

<b>Variável</b>	<b>Zonulina ng/mL, mediana</b>	<b>p</b>
Sexo		<0,001
Feminino	115,60	
Masculino	43,05	
Tabagismo ativo		0,284
Não	107,90	
Sim	53,85	
Tabagismo pregresso		0,974
Não	106,95	
Sim	84,79	
Atividade clínica da doença (ECCO)		0,110
Remissão	89,73	
Atividade	167,90	
Atividade clínica da doença (SCCAI)		0,068
Remissão ( $\leq 2$ )	85,58	
Atividade ( $\geq 3$ )	125,50	
Extensão do acometimento		0,888
E1 – proctite	114,90	
E2 – colite esquerda	106,10	
E3 – colite extensa	89,73	
Internação hospitalar prévia		0,096
Não	74,21	
Sim	112,70	

Legenda: ECCO, Organização Europeia de Crohn e Colite; SCCAI, *Simple Clinical Colitis Activity Index*.

Tabela 15 – Avaliação da concentração sérica da proteína C reativa e da albumina nos pacientes com colite ulcerativa em relação às características clínicas, atividade da doença e extensão do acometimento.

<b>Variável</b>	<b>PCR mg/L, mediana</b>	<b>p</b>	<b>Albumina g/dL, mediana</b>	<b>p</b>
Sexo		0,559		0,025
Feminino	3,2		3,8	
Masculino	2,2		4,0	
Tabagismo ativo		0,133		0,615
Não	2,6		3,9	
Sim	7,5		4,0	
Tabagismo progressivo		0,745		0,831
Não	2,9		3,9	
Sim	2,6		3,9	
Atividade clínica da doença (ECCO)		0,493		0,259
Remissão	2,9		3,9	
Atividade	2,6		4,0	
Atividade clínica da doença (SCCAI)		0,871		0,589
Remissão ( $\leq 2$ )	3,2		3,9	
Atividade ( $\geq 3$ )	2,6		3,9	
Extensão do acometimento		0,967		0,824
E1 – proctite	2,9		3,8	
E2 – colite esquerda	2,6		3,9	
E3 – colite extensa	2,9		4,0	
Internação hospitalar prévia		0,388		0,464
Não	2,6		3,9	
Sim	2,7		3,8	

Legenda: ECCO, Organização Europeia de Crohn e Colite; SCCAI, *Simple Clinical Colitis Activity Index*.

5.4 Análise das concentrações séricas de TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2.

**5.4.1 Análise das concentrações séricas de TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 e a comparação destas entre os pacientes com doença inflamatória intestinal e o grupo controle**

A dosagem das concentrações séricas de TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 foi realizada em 114 dos 117 pacientes com DII e em 8 dos 32 indivíduos do grupo controle. A Tabela 16 resume esses resultados. A mediana da concentração de TNF foi significativamente maior no grupo controle quando comparada ao grupo DII (7,13 pg/mL *versus* 6,17 pg/mL,  $p = 0,045$ ). A mediana da concentração de IFN- $\gamma$  encontrada no grupo DII foi de 14,53 pg/mL e, no grupo controle, esta foi de 15,87 pg/mL ( $p = 0,115$ ). A mediana da concentração de IL-17A foi de 26,38 pg/mL nos indivíduos com DII, sendo que no grupo controle, esta foi de 28,18 pg/mL ( $p = 0,623$ ). A mediana da concentração de IL-10 foi de 7,44 pg/mL no grupo DII e de 7,07 no grupo controle ( $p = 0,620$ ). A mediana da concentração de IL-6 no grupo DII foi de 7,70 pg/mL, e no grupo controle, esta foi de 7,61 ( $p = 0,804$ ). Quando comparadas as concentrações de IL-4 e IL-2 nos dois grupos, foi observado que ambas as concentrações foram menores no grupo DII (15,74 pg/mL *versus* 20,81 pg/mL,  $p = 0,002$  e 10,32 pg/mL *versus* 12,30 pg/mL,  $p = 0,004$ ).

Tabela 16 – Concentrações séricas de TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 e a comparação destas entre os pacientes com doença inflamatória intestinal (n=114) e os indivíduos do grupo controle (n=8).

<b>Citocinas</b>	<b>DII (n=114)</b>	<b>Controle (n=8)</b>	<b>p</b>
TNF pg/mL, mediana	6,17	7,13	0,045
IFN- $\gamma$ pg/mL, mediana	14,53	15,87	0,115
IL-17A pg/mL, mediana	26,38	28,18	0,623
IL-10 pg/mL, mediana	7,44	7,07	0,620
IL-6 pg/mL, mediana	7,70	7,61	0,804
IL-4 pg/mL, mediana	15,74	20,81	0,002
IL-2 pg/mL, mediana	10,32	12,30	0,004

Legenda: DII, doença inflamatória intestinal; TNF, fator de necrose tumoral; IFN-  $\gamma$ , interferon gama; IL-17A, interleucina 17A; IL-10, interleucina 10; IL-6, interleucina 6; IL-4, interleucina 4; IL-2, interleucina 2.

#### 5.4.2 Análise das concentrações séricas de TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 e a comparação destas com o sexo e características clínicas em pacientes com doença inflamatória intestinal

Foi realizada a comparação das concentrações séricas de TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 entre os sexos masculino e feminino em 114 pacientes com DII (Tabela 17).

Tabela 17 – Concentrações séricas de TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 de acordo com o sexo dos pacientes com doença inflamatória intestinal.

<b>Citocinas</b>	<b>Masculino (n=39)</b>	<b>Feminino (n=75)</b>	<b>p</b>
TNF pg/mL, mediana	6,31	6,08	0,938
IFN- $\gamma$ pg/mL, mediana	14,29	14,75	0,926
IL-17A pg/mL, mediana	25,05	26,67	0,243
IL-10 pg/mL, mediana	8,09	7,35	0,317
IL-6 pg/mL, mediana	7,44	7,85	0,971
IL-4 pg/mL, mediana	15,74	15,74	0,696
IL-2 pg/mL, mediana	10,35	10,29	0,622

Legenda: TNF, fator de necrose tumoral; IFN- $\gamma$ , interferon gama; IL-17A, interleucina 17A; IL-10, interleucina 10; IL-6, interleucina 6; IL-4, interleucina 4; IL-2, interleucina 2.

Foram comparadas as concentrações séricas de TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 entre os indivíduos com diagnóstico de DC e UC. Dentre todas as dosagens, a IL-17A e a IL-6 apresentaram uma tendência de maior concentração na DC quando comparada com a UC (Tabela 18).

Tabela 18 – Concentrações séricas de TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 de acordo com o diagnóstico da doença inflamatória intestinal.

<b>Citocinas</b>	<b>Doença de Crohn (n=59)</b>	<b>Colite ulcerativa (n=55)</b>	<b>p</b>
TNF pg/mL, mediana	6,13	6,17	0,727
IFN- $\gamma$ pg/mL, mediana	15,05	14,16	0,246
IL-17A pg/mL, mediana	27,05	25,35	0,055
IL-10 pg/mL, mediana	7,47	7,32	0,575
IL-6 pg/mL, mediana	8,20	7,44	0,062
IL-4 pg/mL, mediana	15,20	16,53	0,195
IL-2 pg/mL, mediana	10,24	10,32	0,753

Legenda: TNF, fator de necrose tumoral; IFN- $\gamma$ , interferon gama; IL-17A, interleucina 17A; IL-10, interleucina 10; IL-6, interleucina 6; IL-4, interleucina 4; IL-2, interleucina 2.

Quando avaliadas as concentrações de TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 em indivíduos com DII que já foram submetidos à internação hospitalar prévia em decorrência de alguma complicação da doença, observou-se que a concentração de IFN- $\gamma$  e de IL-17A foi significativamente mais elevada quando comparadas ao grupo que não foi previamente submetido à internação hospitalar. Em relação à IL-10, também foi demonstrada uma tendência para uma concentração mais elevada nos pacientes com esse antecedente. Esses resultados podem ser visualizados na Tabela 19.

Tabela 19 - Concentrações séricas de TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 de acordo com o histórico de internação hospitalar prévia nos pacientes com doença inflamatória intestinal.

Citocinas	Internação Hospitalar Prévia		<i>p</i>
	Sim (n=65)	Não (n=49)	
TNF pg/mL, mediana	6,36	6,07	0,076
IFN- $\gamma$ pg/mL, mediana	15,10	14,03	0,030
IL-17A pg/mL, mediana	27,11	24,64	0,024
IL-10 pg/mL, mediana	7,81	7,20	0,060
IL-6 pg/mL, mediana	7,99	7,43	0,295
IL-4 pg/mL, mediana	16,24	15,44	0,137
IL-2 pg/mL, mediana	10,86	9,56	0,140

Legenda: TNF, fator de necrose tumoral; IFN- $\gamma$ , interferon gama; IL-17A, interleucina 17A; IL-10, interleucina 10; IL-6, interleucina 6; IL-4, interleucina 4; IL-2, interleucina 2.

Quando comparadas as concentrações séricas de TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 entre os pacientes com DII que já foram submetidos a procedimento cirúrgico prévio e aqueles que não foram submetidos, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações analisadas (Tabela 20).

Tabela 20 - Concentrações séricas de TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 de acordo com o histórico de procedimento cirúrgico prévio nos pacientes com doença inflamatória intestinal.

Citocinas	Procedimento Cirúrgico Prévio		<i>p</i>
	Sim (n=19)	Não (n=95)	
TNF pg/mL, mediana	6,31	6,17	0,637
IFN- $\gamma$ pg/mL, mediana	15,30	14,52	0,130
IL-17A pg/mL, mediana	30,08	25,67	0,070
IL-10 pg/mL, mediana	7,47	7,42	0,882
IL-6 pg/mL, mediana	8,89	7,58	0,128
IL-4 pg/mL, mediana	14,66	15,80	0,831
IL-2 pg/mL, mediana	10,52	10,24	0,755

Legenda: TNF, fator de necrose tumoral; IFN- $\gamma$ , interferon gama; IL-17A, interleucina 17A; IL-10, interleucina 10; IL-6, interleucina 6; IL-4, interleucina 4; IL-2, interleucina 2.



### 5.4.3 Análise da correlação entre as concentrações séricas de TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 e a concentração sérica da zonulina em pacientes com doença inflamatória intestinal

Quando analisada a correlação entre as concentrações de TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 e as concentrações da zonulina, não foram observados resultados estatisticamente significativos, tanto para o grupo DII como um todo, quanto isoladamente por diagnóstico estabelecido (Tabela 21).

Tabela 21 - Correlação das concentrações séricas de TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 com a concentração sérica da zonulina em pacientes com doença inflamatória intestinal.

Citocinas	DII		UC		DC	
	Zonulina		Zonulina		Zonulina	
	$r_s$	$p$	$r_s$	$p$	$r_s$	$p$
TNF	-0,084	0,374	-0,001	0,994	-0,164	0,216
IFN- $\gamma$	-0,042	0,657	0,016	0,905	-0,075	0,573
IL-17A	0,155	0,100	0,195	0,153	-0,114	0,391
IL-10	-0,066	0,486	-0,032	0,816	-0,102	0,443
IL-6	0,047	0,617	0,160	0,245	-0,045	0,738
IL-4	-0,116	0,219	-0,046	0,738	-0,121	0,360
IL-2	-0,116	0,220	-0,061	0,658	-0,169	0,200

Legenda: DII, doença inflamatória intestinal; UC, colite ulcerativa; DC, doença de Crohn; TNF, fator de necrose tumoral; IFN- $\gamma$ , interferon gama; IL-17A, interleucina 17A; IL-10, interleucina 10; IL-6, interleucina 6; IL-4, interleucina 4; IL-2, interleucina 2.

## 6 DISCUSSÃO

Sabidamente a incidência e a prevalência da DII aumentaram de forma significativa no Brasil nos últimos anos. Um dos objetivos do presente estudo foi compreender de forma mais detalhada as características dos pacientes com DII que estão em acompanhamento no ambulatório de gastroenterologia do HU-UFSC, um centro terciário que abrange pacientes provenientes de diferentes regiões do estado de Santa Catarina. O número de casos que fizeram parte do estudo pode ser considerado expressivo, uma vez que esse é o maior estudo de um centro catarinense que caracterizou em detalhes as particularidades de uma amostra de pacientes com DII atendidos exclusivamente pelo sistema único de saúde (SUS).

Em relação à média de idade, distribuição entre os sexos e o diagnóstico (DC *versus* UC), os resultados encontrados neste estudo são semelhantes aos de outros estudos realizados no Brasil – foi observada uma média de idade de 44 anos, uma discreta predominância de acometimento do sexo feminino e uma tendência de distribuição igualitária dos pacientes com DII entre DC e UC (52, 53).

Dentre os pacientes com DC, a localização mais frequentemente acometida foi o íleo terminal (L1), com 33% dos casos. Por sua vez, quando avaliado o comportamento da doença, o mais prevalente foi o inflamatório (B1), este foi observado em 45% dos casos. Mais da metade dos pacientes com DC (56,6%) encontravam-se em remissão clínica da doença, demonstrando uma pontuação no IHB  $\leq$  a 4 pontos. Por meio destas características, é possível concluir que a amostra de pacientes com DC foi constituída por pacientes com uma doença de menor gravidade e de menor extensão, o que resultou em uma menor pontuação no escore de atividade da doença. Por outro lado, quando considerado o diagnóstico de UC, o padrão de acometimento mais comumente encontrado nesta casuística foi o de pancolite (E3), achado este compatível com o perfil de pacientes que se espera que esteja em acompanhamento em um serviço médico terciário (54). Paralelamente aos pacientes com DC, mais da metade dos pacientes com UC encontravam-se em remissão clínica (ECCO – 77,2% e SCCAI – 59,6%). O fato de a maioria dos pacientes com DII encontrarem-se em remissão clínica é corroborado pelos valores das medianas dos parâmetros laboratoriais hemoglobina, hematócrito e albumina – tais valores se mostraram normais e muito semelhantes àqueles encontrados em indivíduos do grupo controle. As concentrações séricas da PCR diferiram desses

outros parâmetros laboratoriais – indivíduos com DII apresentaram valores significativamente mais elevados do que os indivíduos do grupo controle, mas, ainda assim, os valores foram baixos.

No presente estudo não foram observadas diferenças na concentração da zonulina entre os grupos DII e controle, essa ausência de diferença pode ser justificada pelas características da casuística – conforme explorado acima, mais de 50% dos pacientes com DII encontravam-se em remissão clínica. Ainda, do ponto de vista laboratorial, estes também demonstraram uma mediana das concentrações séricas de PCR próximas a 3,0 mg/L, o qual é compatível com remissão laboratorial (31). O espectro do diagnóstico da DII e o antecedente de cirurgia ou internações hospitalares relacionadas à doença de base não influenciaram a concentração sérica da zonulina nos pacientes com DII – dessa forma, a gravidade da DII, por si, ainda que progressiva, não resultou na demonstração de valores mais elevados da zonulina sérica.

Quando avaliada a concentração da zonulina em pacientes com DII, resultados diferentes dos aqui encontrados foram observados em outros estudos. Em um estudo publicado por Caviglia *et al.*, o qual também incluiu uma amostra de pacientes com DII em acompanhamento ambulatorial, foi avaliada a concentração sérica da zonulina e esta foi comparada com aquela apresentada por indivíduos do grupo controle, sendo observada uma concentração mais elevada no primeiro grupo. Em relação à metodologia deste estudo, é importante ressaltar que a grande maioria da população avaliada apresentava critérios compatíveis com atividade clínica (IHB para DC e escore de Mayo simplificado para UC) e laboratorial presentes – a mediana da concentração de calprotectina foi de 345 µg/g (45). Em outro estudo do mesmo autor, foi observado que a concentração sérica da zonulina era mais elevada em pacientes com DII em atividade clínica do que naqueles em remissão, ainda que a diferença tenha sido discreta. É importante ressaltar, também, que a casuística em questão foi constituída por mais de 70% de pacientes com DII em atividade clínica (44).

Em relação ao sexo, observou-se uma diferença estatística nas concentrações séricas da zonulina, tendo estas sido mais elevadas nas mulheres do que as observadas no sexo masculino. Maget *et al.* observaram concentrações mais elevadas da zonulina em mulheres quando comparadas a indivíduos do sexo masculino em um estudo que avaliou a concentração sérica de zonulina no contexto de transtornos psiquiátricos (55).

Um estudo caso-controle realizado por autores americanos e publicado em 2015 demonstrou uma maior concentração da zonulina em mulheres portadoras de síndrome dos ovários policísticos (SOP) em comparação a mulheres sem a síndrome (56). A SOP é uma síndrome muito frequente em mulheres em idade reprodutiva – ainda que seja um diagnóstico de exclusão, esta condição está presente em 5-20% das mulheres no menacme em todo o mundo (57). Explorando os resultados encontrados neste estudo poderíamos questionar se as maiores concentrações da zonulina observadas nessa população teriam relação com o hiperandrogenismo e hiperandrogenemia apresentados por uma parcela considerável das pacientes com SOP ou com o estado de resistência à insulina, aspecto este de fundamental importância na fisiopatologia da síndrome. Os mesmos autores não demonstraram correlação entre as concentrações séricas da zonulina e as concentrações de testosterona total, sendo a hipótese principal do estudo a de que as concentrações séricas da zonulina foram mais elevadas em pacientes com SOP em função da resistência insulínica que pacientes com essa condição apresentam, de forma independente ao IMC (56).

No presente estudo foi observada uma correlação positiva moderada entre as concentrações séricas da zonulina e o IMC em pacientes com DII. O sobrepeso e a obesidade são condições cada vez mais prevalentes e sabidamente relacionadas à resistência insulínica e a um estado inflamatório de baixo grau (58). A relação entre zonulina e resistência insulínica foi previamente estudada, com destaque para um dos primeiros estudos nessa área, publicado por Moreno-Navarrete *et al.*, que avaliou 123 indivíduos e demonstrou que os níveis circulantes de zonulina aumentam paralelamente aos valores de IMC, aos valores da relação cintura/quadril (marcador importante de adiposidade visceral e resistência insulínica), às concentrações de insulina em jejum, às concentrações de triglicérides, ácido úrico e IL-6. Por outro lado, as concentrações da zonulina correlacionaram-se negativamente com as concentrações de HDL-colesterol e com a sensibilidade à insulina (59). A obesidade, por si, parece influenciar a permeabilidade intestinal – alguns estudos em modelos animais já demonstraram que uma dieta rica em gorduras saturadas resulta em modificações da microbiota intestinal e aumento da permeabilidade intestinal (60). Esse aumento da permeabilidade intestinal, por sua vez, contribui para a instalação de um estado inflamatório de baixo grau e de resistência insulínica (61).

Em pacientes com UC, as concentrações da zonulina correlacionaram-se com variáveis associadas à gravidade e atividade da doença, como a pontuação no SCCAI, concentrações de PCR, albumina, hemoglobina e hematócrito. Esse resultado pode ser atribuído às características dos pacientes com UC estudados; o padrão de acometimento mais comum foi a pancolite (E3), representando uma doença mais extensa e grave e, conseqüentemente, mais sintomática. Esse mesmo resultado não foi encontrado nos pacientes com DC (não houve correlação entre as concentrações da zonulina e o IHB), fato esse que pode ser justificado pela maior heterogeneidade da doença nesse espectro da DII (DC). Nos pacientes com DC, em geral, segmentos menores do trato gastrointestinal encontram-se acometidos, possivelmente impactando menos a permeabilidade intestinal. Alguns parâmetros não avaliados no presente estudo podem ter influenciado nessa análise específica. Entre esses parâmetros estão a extensão do acometimento do íleo terminal (já que a maior parte dos pacientes tinha como principal localização de acometimento este segmento do intestino (L1) e a presença ou não de atividade endoscópica. Além disso, o tamanho da amostra desse subgrupo de pacientes poderia ter sido insuficiente para verificar a correlação entre as concentrações da zonulina e a atividade clínica da DC.

São poucos os estudos que correlacionaram escores de atividade clínica na DII e concentrações da zonulina sérica, mas estudos que avaliaram a zonulina de outras formas e por métodos diferentes foram publicados nos últimos anos. Szymanska *et al.* observaram uma correlação positiva fraca entre a zonulina e o índice de atividade na DC, mas não na UC. Ainda que esse estudo tenha demonstrado uma correlação positiva na DC, essa interpretação deve ser cautelosa, pois esse estudo foi realizado em população pediátrica e a dosagem de zonulina foi realizada nas fezes (62). Guardados esses cuidados em relação ao estudo, a demonstração da presença de correlação entre escores clínicos na DII e a zonulina demonstra uma possível contribuição da utilização da zonulina na avaliação e seguimento de pacientes com DII.

Considerando que concentrações mais elevadas de zonulina estariam relacionadas com o aumento da permeabilidade intestinal e, conseqüentemente, a um *status* inflamatório, os resultados aqui observados justificam, em parte, a correlação positiva entre a zonulina e PCR – marcador inflamatório – e a correlação negativa entre a zonulina e a albumina, hemoglobina e hematócrito nos pacientes com UC. A anemia e a desnutrição são complicações encontradas na DII, que se relacionam com

a gravidade da doença (63, 64). Mesmo que a correlação tenha sido observada somente no grupo UC, é possível que concentrações mais elevadas de zonulina estejam relacionadas com a gravidade, atividade clínica e laboratorial da doença. Deve-se também levar em consideração, nessa análise, a possibilidade da interferência de fatores externos como, por exemplo, o sexo e o IMC.

Em relação às citocinas inflamatórias, foram avaliadas as concentrações séricas de TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2. Não foram observadas diferenças quando os pacientes com DII foram comparados aos indivíduos do grupo controle. Pelo contrário, essa análise demonstrou que indivíduos do grupo controle demonstraram concentrações mais elevadas de TNF, IL-4 e IL-2. É importante reforçar que não foi possível realizar a dosagem das citocinas em todos os indivíduos pertencentes ao grupo controle; é possível que o número relativamente pequeno de pacientes saudáveis avaliados tenha comprometido essa avaliação. Outras justificativas plausíveis para esse resultado remetem ao fato de a grande maioria dos pacientes com DII não estarem em atividade clínica no momento dessa avaliação e ao fato de uma parcela significativa dos pacientes estarem realizando tratamento farmacológico sistêmico (corticosteroide, imunomodulador e imunobiológicos) e, ainda, ao método utilizado em nosso estudo para a avaliação (dosagem sérica).

Em um estudo de Tatsuki *et al.*, que envolveu uma casuística pediátrica em atividade clínica e endoscópica moderada a severa e sem tratamento para DII, foram observadas diferenças na concentração das citocinas TNF, IL-6 e IL-4, porém não foram observadas diferenças nas concentrações de IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-10 e IL-2 quando comparados ao grupo controle (65). Alguns estudos avaliaram a expressão das citocinas inflamatórias por métodos diferentes; estudos que avaliaram a expressão dessas citocinas em fragmentos da mucosa intestinal, notadamente de TNF e IFN- $\gamma$ , conseguiram demonstrar aumento da expressão dessas citocinas na lâmina própria (66).

Dentre os pacientes com DII, aqueles que apresentaram histórico de internação hospitalar prévia relacionada a essa condição demonstraram concentrações séricas de IFN- $\gamma$  e IL-17A mais elevadas do que pacientes sem esse antecedente ( $p = 0,030$  e  $p = 0,024$ , respectivamente). Ainda, observou-se uma tendência a esse mesmo achado para a IL-10 ( $p = 0,060$ ). Figueredo *et al.* observaram que pacientes com DII em atividade apresentavam maior expressão de IL-17A na mucosa intestinal quando comparados com aqueles em remissão (67). Quando comparados pacientes com DC

àqueles com UC, foi observada uma tendência a valores mais elevados de IL-17A e IL-6 no primeiro grupo, achados esses compatíveis com a ativação da via Th17 que, de fato, é uma das vias envolvidas na fisiopatologia da DC (51).

Os pontos positivos deste trabalho são o tamanho da casuística, tendo em vista a raridade dessa condição (ainda que a prevalência tenha aumentado nos últimos anos), a obtenção de dados completos acerca das características epidemiológicas, clínicas e evolução dos pacientes compreendidos nesta casuística e a composição de um grupo controle. A possibilidade de avaliação, além das concentrações séricas da zonulina, das concentrações séricas de diferentes citocinas inflamatórias, também permitiu uma melhor investigação da relação entre inflamação e zonulina. Ainda, este foi o primeiro estudo conduzido na linha de doenças inflamatórias intestinais no HU-UFSC, o que poderá contribuir para a ampliação das atividades de pesquisa em doenças do aparelho digestivo.

As limitações do presente estudo incluem a sua natureza transversal, que impede a avaliação da relação dos biomarcadores estudados com desfechos clínicos relevantes. Além disso, a amostra estudada foi composta majoritariamente por pacientes em remissão clínica da DII, o que pode ter dificultado a análise do impacto da atividade da doença sobre as concentrações séricas da zonulina. Ainda que tal fato deva ser levado em consideração na interpretação dos resultados, a casuística aqui apresentada representa a prática diária da maioria dos serviços que acompanham pacientes portadores de DII. Estudos que venham a investigar as concentrações da zonulina em diferentes perfis de pacientes com DII, especialmente incluindo análise endoscópica e histológica, serão importantes para melhor definição do papel desse biomarcador na DII.

Outro fator importante a ser levado em consideração é o método utilizado na dosagem da zonulina sérica. Diferentes kits comerciais estão disponíveis no mercado para a utilização em pesquisa clínica, entretanto são poucos os estudos que utilizaram o mesmo kit que o utilizado aqui - Elabscience® (Bethesda, EUA) (68, 69). Ajamian *et al.* avaliaram dois kits comerciais, um que utiliza o método ELISA sanduíche – CUSABIO® (Wuhan, China) e, o outro, que utiliza o método ELISA competição Immundiagnostik AG® (Bensheim, Alemanha) – os autores concluíram que os kits disponíveis necessitariam de melhorias para uma melhor detecção da zonulina/préheaptoglobina-2 (70). Novos estudos investigando a acurácia dos métodos

comerciais disponíveis são necessários antes que uma aplicação prática para a dosagem de zonulina possa ser proposta.



## 7 CONCLUSÕES

No presente estudo a concentração sérica da zonulina não diferiu na comparação entre os pacientes com DII e controles saudáveis, assim como entre os dois fenótipos de DII estudados. Características não relacionadas à doença intestinal, como sexo e IMC, impactaram significativamente nos níveis da zonulina entre os portadores de DII. A zonulina circulante se correlacionou fracamente a parâmetros clínicos e laboratoriais rotineiros de gravidade e de atividade de doença em portadores de UC, mas não entre aqueles com DC. Entretanto, não foram observadas associações entre as concentrações séricas das diferentes citocinas inflamatórias estudadas e a zonulina. Em conjunto, esses resultados indicam potencial da zonulina como biomarcador nas DII, particularmente na UC, ainda que possivelmente a aplicação prática deste teste laboratorial seja limitada em virtude da interferência de fatores não relacionados à doença de base.

## REFERÊNCIAS

- (1) WINDSOR, J. W.; KAPLAN, G. G. Evolving Epidemiology of IBD. **Current Gastroenterology Reports**, v. 21, n. 8, 2019.
- (2) KAPLAN, G. G. The global burden of IBD: From 2015 to 2025. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 12, n. 12, p. 720–727, 2015.
- (3) NG, S. C.; SHI, H. Y.; HAMIDI, N.; UNDERWOOD, F. E. *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.
- (4) KOTZE, P. G.; UNDERWOOD, F. E.; DAMIAO, A. O. M. C.; FERRAZ, J. G. P. *et al.* Progression of Inflammatory Bowel Diseases Throughout Latin America and the Caribbean: A Systematic Review. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 18, n. 2, p. 304–312, 2020.
- (5) CHANG, J. T. Pathophysiology of inflammatory bowel diseases. **The New England Journal of Medicine**, n. 383, p. 2652–64, 2020.
- (6) ABEGUNDE, A. T.; MUHAMMAD, B. H.; BHATTI, O.; ALI, T. Environmental risk factors for inflammatory bowel diseases: Evidence based literature review. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 27, p. 6296–6317, 2016.
- (7) TARGAN, S. R.; KARP, L. C. Defects in mucosal immunity leading to ulcerative colitis. **Immunological Reviews**, v. 206, p. 296–305, 2005.
- (8) RODA, G.; NG, S. C.; KOTZE, P. G.; ARGOLLO, M. *et al.* Crohn's disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 6, n. 1, 2020.
- (9) FLYNN, S.; EISENSTEIN, S. Inflammatory Bowel Disease Presentation and Diagnosis. **Surgical Clinics of North America**, v. 99, n. 6, p. 1051–1062, 2019.
- (10) SILVERBERG, M. S.; SATSANGI, J.; AHMAD, T.; ARNOTT, I. D. R.; BERNSTEIN, C. N. *et al.* **Canadian Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. A:5A-36A. p. 1–32, 2005.
- (11) GAJENDRAN, M.; LOGANATHAN, P.; JIMENEZ, G.; CATINELLA, A. P. *et al.* A comprehensive review and update on ulcerative colitis. **Disease-a-Month**, v. 65, n. 12, 2019.
- (12) MAASER, C.; STURM, A.; VAVRICKA, S. R.; KUSHARZIK, T. *et al.* ECCO-ESGAR Guideline for Diagnostic Assessment in IBD Part 1: Initial diagnosis, monitoring of known IBD, detection of complications. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 13, n. 2, p. 144–164, 2019.
- (13) BERTANI, L.; MUMOLO, G. M.; TAPETE, G.; ALBANO, E. *et al.* Fecal calprotectin: Current and future perspectives for inflammatory bowel disease treatment. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 32, n. 9, p. 1091–1098, 2020.
- (14) GOMOLLÓN, F.; DIGNASS, A.; ANNESE, V.; TILG, H. *et al.* 3rd European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease 2016: Part 1: Diagnosis and medical management. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 11, n. 1, p. 3–25, 2017.
- (15) MAGRO, F.; GIONCHETTI, P.; ELIAKIM, R.; ARDIZZONE, S. *et al.* Third European evidence-based consensus on diagnosis and management of ulcerative colitis. Part 1: Definitions, diagnosis, extraintestinal manifestations, pregnancy, cancer surveillance, surgery, and ileo-anal pouch disorders.

- Journal of Crohn's and Colitis**, v. 11, n. 6, p. 649–670, 2017.
- (16) LAMB, C. A.; KENNEDY, N. A.; RAINE, T.; HENDY, P. A. *et al.* British Society of Gastroenterology consensus guidelines on the management of inflammatory bowel disease in adults. **Gut**, v. 68, p. s1–s106, 2019.
  - (17) HARBORD, M.; ELIAKIM, R.; BETTENWORTH, D.; KARMIRIS, K. *et al.* Third European evidence-based consensus on diagnosis and management of ulcerative colitis. Part 2: Current management. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 11, n. 7, p. 769–784, 2017.
  - (18) TORRES, J.; BONOVAS, S.; DOHERTY, G.; KUCHARSIK, T. *et al.* ECCO guidelines on therapeutics in Crohn's disease: Medical treatment. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 14, n. 1, p. 4–22, 2020.
  - (19) ROMANO, C.; ESPOSITO, S.; FERRARA, R.; CUOMO, G. *et al.* Choosing the most appropriate biologic therapy for Crohn's disease according to concomitant extraintestinal manifestations, comorbidities, or physiologic conditions. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 20, n. 1, p. 49–62, 2020.
  - (20) HVAS, C. L.; BENDIX, M.; DIGE, A.; DAHLERUP, J. F. *et al.* Current, experimental, and future treatments in inflammatory bowel disease: a clinical review. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 40, n. 6, p. 446–460, 2018.
  - (21) NA, S. Y.; MOON, W. Perspectives on current and novel treatments for inflammatory bowel disease. **Gut and Liver**, v. 13, n. 6, p. 604–616, 2019.
  - (22) WALMSLEY, R. S.; AYRES, R. C.; POUNDER, R. E.; ALLAN, R. N. A simple clinical colitis activity index. **Gut**, v. 43, n. 1, p. 29–32, 1998.
  - (23) WALSH, A. J.; BRYANT, R. V.; TRAVIS, S. P. L. Current best practice for disease activity assessment in IBD. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 13, n. 10, p. 567–579, 2016.
  - (24) SILVIA POP, C.; FILIP, P. V.; DIACONU, S. L.; MATEI, C. *et al.* Correlation of biomarkers with endoscopic score: Ulcerative colitis endoscopic index of severity (UCEIS) in patients with ulcerative colitis in remission. **Medicina (Lithuania)**, v. 57, n. 1, p. 1–11, 2021.
  - (25) HARVEY, R. F.; BRADSHAW, J. M. Methods and Devices – A simple index of Crohn's-disease activity. **Lancet**, v. 315, n. 8167, p. 514, 1980.
  - (26) VERMEIRE, S.; SCHREIBER, S.; SANDBORN, W. J.; DUBOIS, C. *et al.* Correlation Between the Crohn's Disease Activity and Harvey-Bradshaw Indices in Assessing Crohn's Disease Severity. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 8, n. 4, p. 357–363, 2010.
  - (27) BEST, W. R. Predicting the Crohn's disease activity index from the Harvey-Bradshaw Index. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 12, n. 4, p. 304–310, 2006.
  - (28) TILLET, W. S.; FRANCIS, T. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. **Journal of Experimental Medicine**, v. 52, n. 4, p. 561–571, 1930.
  - (29) VERMEIRE, S.; ASSCHE, G. V.; RUTGEERTS, P. C-Reactive protein as a marker for inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Disease**, v. 10, n. 5, p. 661–665, 2004.
  - (30) MOSLI, M. H.; ZOU, G.; GARG, S. K.; FEAGAN, S. G. *et al.* C-reactive protein, fecal calprotectin, and stool lactoferrin for detection of endoscopic activity in symptomatic inflammatory bowel disease patients: A systematic review and meta-analysis. **American Journal of Gastroenterology**, v. 110, n. 6, p. 802–819, 2015.

- (31) TURNER, D.; RICCIUTO, A.; LEWIS, A.; D'AMICO, F. *et al.* STRIDE-II: An Update on the Selecting Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease (STRIDE) Initiative of the International Organization for the Study of IBD (IOIBD): Determining Therapeutic Goals for Treat-to-Target strategies in IBD. **Gastroenterology**, v. 160, n. 5, p. 1570–1583, 2021.
- (32) Hibi, T.; SAKURABA, A.; WATANABE, M.; MOTOYA, S. *et al.* C-reactive protein is an indicator of serum infliximab level in predicting loss of response in patients with Crohn's disease. **Journal of Gastroenterology**, v. 49, n. 2, p. 254–262, 2014.
- (33) GRANT, R. K.; JONES, G.R.; PLEVRIS, N.; LYNCH, R. W. *et al.* The ACE (Albumin, CRP and Endoscopy) Index in Acute Colitis: A Simple Clinical Index on Admission that Predicts Outcome in Patients With Acute Ulcerative Colitis. **Inflammatory bowel diseases**, v. 27, n. 4, p. 451–457, 2021.
- (34) CAMILLERI, M. The leaky gut: mechanisms, measurements and clinical Implications in Humans. **Gut**, v. 68, n. 8, p. 1516–1526, 2020.
- (35) FARQUHAR, M. G. Junctional Complexes in Various Epithelia. **The Journal of Cell Biology**, v. 17, n. 2, p. 375–412, 1963.
- (36) ODENWALD, M. A.; TURNER, J. R. The intestinal epithelial barrier: A therapeutic target? **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 14, n. 1, p. 9–21, 2017.
- (37) WANG, W.; UZZAU, S.; GOLDBLUM, S. E.; FASANO, A. Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. **Journal of Cell Science**, v. 113, n. 24, p. 4435–4440, 2000.
- (38) FASANO, A. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: The biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 1, p. 151–175, 2011.
- (39) STURGEON, C.; FASANO, A. Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier functions, and its involvement in chronic inflammatory diseases. **Tissue Barriers**, v. 4, n. 4, 2016.
- (40) SCHOULTZ, I.; KEITA, Å. V. The Intestinal Barrier and Current Techniques for the Assessment of Gut Permeability. **Cells**, v. 9, n. 8, p. 1–30, 2020.
- (41) WYATT, J. *et al.* Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. **The Lancet**, v. 341, n. 8858, p. 1437–1439, 1993.
- (42) FASANO, A.; NOT, T.; WANG, W.; UZZAU, S.; BERTI, I. *et al.* TOMMASINI, A.; GOLDBLUM, S. E. Zonulin , a newly discovered modulator of intestinal permeability , and its expression in coeliac disease. **Lancet**, v. 355, p. 1518–1519, 2000.
- (43) SAPONE, A.; MAGISTRIS, L.; PIETZAK, M.; CLEMENTE, M. G. *et al.* Zonulin upregulation is associated with increased gut permeability in subjects with type 1 diabetes and their relatives. **Diabetes**, v. 55, n. 5. p. 1443-1449, 2006.
- (44) CAVIGLIA, G. P.; ROSSO, C.; STALLA, F.; RIZZO, M. *et al.* On-Treatment Decrease of Serum Interleukin-6 as a Predictor of Clinical Response to Biologic Therapy in Patients with Inflammatory Bowel Diseases. **Journal Clinical Medicine**, v. 9, n. 3, p. 1–12, 2020.
- (45) CAVIGLIA, G. P.; DUGHERA, F.; RIBALDONE, D. G.; ROSSO, C. *et al.* Serum zonulin in patients with inflammatory bowel disease: a pilot study. **Minerva Medicine**, v. 110, n. 2, p. 95-100, 2018.
- (46) BROWN, S. J.; MAYER, L. The immune response in inflammatory

- bowel disease. **American Journal of Gastroenterology**, v. 102, n. 9, p. 2058–2069, 2007.
- (47) PARKIN, J.; COHEN, B. An Overview of the Immune System. **Lancet**, v. 357, p. 1779–1789, 2001.
- (48) GEREMIA, A.; BIANCHERI, P.; ALLAN, P.; CORAZZA, G.R. *et al.* Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. 1, p. 3–10, 2014.
- (49) XU, X. R.; LIU, C. Q.; FENG, B. S.; LIU, Z. J. Dysregulation of mucosal immune response in pathogenesis of inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 12, p. 3255–3264, 2014.
- (50) KATSANOS, K. H.; PAPADAKIS, K. A. Inflammatory bowel disease: Updates on molecular targets for biologics. **Gut and Liver**, v. 11, n. 4, p. 455–463, 2017.
- (51) AHLUWALIA, B.; MORAES, L.; MAGNUSSON, M. K.; OHMAN, L. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 53, n. 4, p. 379–389, 2018.
- (52) SANTOS, R. M.; CARVALHO, A. T. P.; SILVA, K. S.; SÁ, S. P. S. *et al.* Inflammatory Bowel Disease: Outpatient Treatment Profile. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 54, n. 2, p. 96–100, 2017.
- (53) GASPARINI, R. G.; SASSAKI, L. Y.; SAAD-HOSSNE, R. Inflammatory bowel disease epidemiology in São Paulo State, Brazil. **Clinical and Experimental Gastroenterology**, v. 11, p. 423–429, 2018.
- (54) GOMES, T. N. F.; DE AZEVEDO, F. S.; ARGOLLO, M.; MISZPUTEN, S. J. *et al.* Clinical and demographic profile of inflammatory bowel disease patients in a reference center of São Paulo, Brazil. **Clinical and Experimental Gastroenterology**, v. 14, p. 91–102, 2021.
- (55) MAGET, A.; DALKNER, N.; HAMM, C.; BENGESSER, S.A. *et al.* Sex differences in zonulin in affective disorders and associations with current mood symptoms. **Journal of Affective Disorders**, v. 294, p. 441–448, 2021.
- (56) AZZIZ, R.; CARMINA, E.; CHEN, Z.; DUNAIF, A. *et al.* Polycystic ovary syndrome. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 11, n. 2, p. 16057, 2016.
- (57) COX, A. J.; WEST, N. P.; CRIPPS, A. W. Obesity, inflammation, and the gut microbiota. **The Lancet Diabetes and Endocrinology**, v. 3, n. 3, p. 207–215, 2015.
- (58) MORENO-NAVARRETE, J. M.; SABATER, M.; ORTEGA, F.; RICART W, FERNANDEZ-REAL, J. M. Circulating zonulin, a marker of intestinal permeability, is increased in association with obesity-associated insulin resistance. **PLoS One**, v. 7, n. 5, 2012.
- (59) CANI, P. D.; BIBILONI, R.; KNAUF, C.; WAGET, A. *et al.* Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. **Diabetes**, v. 57, n. 6, p. 1470–81, 2008.
- (60) GENSER, L.; POITOU, C.; BROT-LAROCHE, É.; ROUSSET, M. *et al.* L'altération de la perméabilité intestinale: chaînon manquant entre dysbiose et inflammation au cours de l'obésité ? [Alteration of intestinal permeability: the missing link between gut microbiota modifications and inflammation in obesity?]. **Med Sci (Paris)**, v. 32, n. 5, p. 461–9, 2016.
- (61) SZYMANSKA, E.; WIERZBICKA, A.; DADALSKI, M.; KIERKUS, J. Fecal

- zonulin as a noninvasive biomarker of intestinal permeability in pediatric patients with inflammatory bowel diseases — correlation with disease activity and fecal calprotectin. *Journal Clinical Medicine*, v. 10, n. 17, p. 4–11, 2021.
- (62) BLANEY, H.; VU, P.; MATHEW, A.; SNELLING, R. *et al.* Anemia Severity Associated with Increased Healthcare Utilization and Costs in Inflammatory Bowel Disease. ***Digestive Diseases and Sciences***, v. 66, n. 8, p. 2555–2563, 2021.
- (63) KHAN, N.; PATEL, D.; SHAH, Y.; TRIVED, C. YANG, Y-X. Albumin as a prognostic marker for ulcerative colitis. ***World Journal of Gastroenterology***, v. 23, n. 45, p. 8008–8016, 2017.
- (64) TATSUKI, M.; HATORI, R.; NAKAZAWA, T.; ISHIGE, T. *et al.* Serological cytokine signature in paediatric patients with inflammatory bowel disease impacts diagnosis. ***Scientific Reports***, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2020.
- (65) EICHELE, D. D.; KHARBANDA, K. K. Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. ***World Journal of Gastroenterology***, v. 23, n. 33, p. 6016–6029, 2017.
- (66) FIGUEREDO, C. M.; MARTINS, A. P.; LIRA-JUNIOR, R.; MENEGAT, J. B. *et al.* Activity of inflammatory bowel disease influences the expression of cytokines in gingival tissue. ***Cytokine***, v. 95, p. 1–6, 2017.
- (67) DRABIŃSKA, N.; KRUPA-KOZAK, U.; JAROCKA-CYRТА, E. Intestinal permeability in children with celiac disease after the administration of oligofructose-enriched inulin into a gluten-free diet—results of a randomized, placebo-controlled, pilot trial. ***Nutrients***, v. 12, n. 6, p. 1–15, 2020.
- (68) DEMIR, E.; OZKAN, H.; SECKIN, K. D.; SAHTIYANCI, B. *et al.* Plasma zonulin levels as a non-invasive biomarker of intestinal permeability in women with gestational diabetes mellitus. ***Biomolecules***, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2019.
- (69) AJAMIAN, M.; STEER, D.; ROSELLA, G.; GIBSON, P. R. Serum zonulin as a marker of intestinal mucosal barrier function: May not be what it seems. ***PLoS ONE***, v. 14, n. 1, p. 1–14, 2019.

## ANEXO A – Parecer consubstanciado do CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ESTUDO DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS EM PACIENTES COM DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

**Pesquisador:** Leonardo de Lucca Schiavon

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 70271617.1.0000.0121

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Catarina

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA E INOVAÇÃO DO ESTADO DE SANTA CATARINA

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.308.479

#### Apresentação do Projeto:

Projeto de Mestrado Acadêmico vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da UFSC e orientado pelo Prof. Leonardo de Lucca Schiavon (Depto. de Clínica Médica). A pesquisa busca estudar os níveis séricos de zonulina em portadores de Doenças Inflamatórias Intestinais (DII). É um estudo de coorte prospectivo que incluirá pacientes adultos (entre 18 e 65 anos) com diagnóstico de DII e que estão em seguimento regular no ambulatório de doenças intestinais do Serviço de Gastroenterologia do HUUFSC. Serão excluídos aqueles com diagnóstico duvidoso de doença inflamatória intestinal; internações hospitalares recentes (últimos 30 dias) não relacionadas a complicações da doença inflamatória intestinal; doença infecciosa aguda (últimos 7 dias) ou crônica ativa; paciente portador de outra patologia inflamatória crônica (não-relacionadas à DII) e neoplasias malignas. Os pacientes serão avaliados no dia de sua consulta de rotina e reavaliados entre o quinto e sétimos meses após a avaliação inicial. Além da avaliação clínica e exame físico dos participantes no dia da consulta ambulatorial, serão coletadas amostras de sangue e urina para realização dos exames laboratoriais da pesquisa. Os seguintes parâmetros laboratoriais serão estudados no soro nas duas avaliações: zonulina, citocinas inflamatórias, neoptertina, mieloperoxidase, tripsase, pentraxina-3 e microRNAs. A população total do estudo será de 149 participantes, sendo 116 pacientes, considerando comparação da média de zonulina

**Endereço:** Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R. Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401  
**Bairro:** Trindade **CEP:** 88.040-400  
**UF:** SC **Município:** FLORIANOPOLIS  
**Telefone:** (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Protocolo: 2.306.479

em dois grupos independentes (DII em remissão clínica e laboratorial e DII em atividade clínica e laboratorial) e 33 indivíduos saudáveis pareados por sexo e idade que serão avaliados como grupo controle.

**Objetivo da Pesquisa:**

Estudar os níveis séricos de zonulina em portadores de DII.

**Objetivo Secundário:**

- Descrever as características demográficas e clínicas dos portadores de DII em acompanhamento no ambulatório de doenças intestinais do Serviço de Gastroenterologia do HU-UFSC;
- Comparar os níveis de zonulina entre portadores de DII e controles saudáveis;
- Comparar portadores de RCU eDC quanto aos níveis de zonulina;
- Estudar o impacto de parâmetros relacionados à atividade das DII (escores clínicos e exames laboratoriais) sobre os níveis séricos de zonulina;
- Investigar a relação entre os níveis de zonulina e biomarcadores relacionados à atividade inflamatória citocinas inflamatórias, neoptertina, mieloperoxidase, tripsase e pentraxina-3);
- Estudar a relação entre microRNAs (sangue e urina) e o diagnóstico, padrão e atividade na DII;
- Estudar a progressão dos biomarcadores ao longo do período de estudo, relacionando-a à atividade da doença e evolução para complicações.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos foram incluídos no formulário PB conforme solicitado pelo CEPIS, os quais foram especificados como segue: "Os riscos relacionados à coleta de sangue em veia periférica são considerados muito baixos e incluem dor local, formação de hematoma e infecções

locais. Caso ocorra, o tratamento será realizado através de orientações e/ou curativo simples e/ou o uso de analgésicos simples e/ou o uso de antibióticos convencionais. Não haverá risco de morbidade significativa ou dano relacionados a este estudo. O atendimento prestado no ambulatório não será modificado devido a realização da pesquisa, como também, não será realizada nenhuma modificação no seguimento e tratamento do paciente portador de doença inflamatória intestinal."

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O cronograma foi readequado no formulário PB e no arquivo do projeto completo.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O TCLE foi readequado conforme as seguintes solicitações: Inclusão do endereço completo do

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R. Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401  
 Bairro: Trindade CEP: 88.040-400  
 UF: SC Município: FLORIANOPOLIS  
 Telefone: (48)3721-6004 E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br



Continuação do Parecer: 2.306.479

CEPSH, inserção dos benefícios da pesquisa ao participante, bem como da declaração do pesquisador em que se compromete a seguir os Termos da Resolução 466/12 do CNS e de suas complementares.

**Recomendações:**

Sem recomendações adicionais.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Os pesquisadores atenderam à todas as solicitações do CEPSC e portanto, o projeto e está aprovado.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_929708.pdf	27/08/2017 16:21:33		Aceito
Outros	RESPOSTA_AS_PENDENCIAS.pdf	27/08/2017 16:20:42	LUIZ AUGUSTO CARDOSO LACOMBE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	27/08/2017 16:14:59	LUIZ AUGUSTO CARDOSO LACOMBE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Dii.pdf	27/08/2017 16:14:33	LUIZ AUGUSTO CARDOSO LACOMBE	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_responsabilidade_pesquisador.pdf	26/06/2017 20:38:34	LUIZ AUGUSTO CARDOSO LACOMBE	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_instituicao_CNS466.pdf	26/06/2017 20:37:49	LUIZ AUGUSTO CARDOSO LACOMBE	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	26/06/2017 20:35:51	LUIZ AUGUSTO CARDOSO LACOMBE	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R. Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401  
 Bairro: Trindade CEP: 88.040-400  
 UF: SC Município: FLORIANOPOLIS  
 Telefone: (48)3721-8094 E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Processo: 2.506.479

FLORIANOPOLIS, 02 de Outubro de 2017

---

Assinado por:  
Yimar Correa Neto  
(Coordenador)

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R. Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401  
Bairro: Trindade CEP: 88.040-400  
UF: SC Município: FLORIANOPOLIS  
Telefone: (48)3721-8094 E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

## ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CCS - DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### **ESTUDO DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS EM PACIENTES COM DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL**

Você está sendo convidado para participar do projeto de pesquisa: **ESTUDO DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS EM PACIENTES COM DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL**. Este projeto tem o objetivo de identificar dados da avaliação médica ou de exames laboratoriais que possam nos ajudar a identificar os pacientes com doença mais grave e com maior risco de complicações. Os resultados desta pesquisa poderão permitir a criação de ferramentas para a identificação rápida dos pacientes com doença mais grave, permitindo assim um tratamento mais adequado.

Caso você concorde em participar deste estudo, será feita uma avaliação clínica (entrevista e exame físico) após a sua consulta de rotina. Além disso, uma coleta de sangue realizada por punção periférica na veia do antebraço será agendada. Parte do material será destinada aos exames de rotina (que são necessários para avaliação do seu caso durante o acompanhamento) e uma outra porção será armazenadas em freezer a -80° C para a posterior dosagem dos exames referentes ao estudo, que são: zonulina, citocinas inflamatórias ( IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), neopterinina, mieloperoxidase, tripsase e pentraxina-3. Além destes exames, serão investigados os níveis de miRNAs em amostras de sangue e urina.

Não existem riscos importantes relacionados a tais procedimentos, podendo ocorrer, como consequência da coleta de sangue, dor no local da punção e/ou formação de hematoma local.

Não há benefício direto para o participante. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os principais investigadores envolvidos são o médico Luiz Augusto Cardoso Lacombe e o médico Dr. Leonardo de Lucca Schiavon que podem ser encontrados no endereço: Departamento de Clínica Médica, Hospital Universitário/Campus Universitário – Trindade - Cep 88040-970 - Florianópolis – SC Fone (48) 37219149/37219014; e-mail: [luiz.lacombe@hotmail.com](mailto:luiz.lacombe@hotmail.com). Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP): Universidade Federal de Santa Catarina; Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão - Campus Universitário - Trindade - Florianópolis/SC; Tel: (48) 3721-9206.

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

Você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, assim que os mesmos forem de conhecimento dos pesquisadores.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CCS - DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

Segue abaixo os termos da declaração para poder participar do estudo:

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito do estudo "ESTUDO DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS EM PACIENTES COM DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL".

Eu discuti com os pesquisadores responsáveis sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar, caso seja necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento: antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo, perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

---

Nome do participante	Assinatura	Data
----------------------	------------	------

---

Responsável pelo estudo	Assinatura	Data
-------------------------	------------	------

### ANEXO C – Instrumento para coleta de dados clínicos

<b>Análise da Permeabilidade Intestinal Através de Biomarcador Sérico e sua Correlação com Escores de Atividade Clínica e Proteína C Reativa em Pacientes com Doença Inflamatória Intestinal</b>				
<b>Dados de identificação e contato</b>				
Nome:				nome
Número do prontuário:				num_pront
Data da avaliação: ____/____/____				data_aval
Data de nascimento: ____/____/____				data_nasc
Telefone residencial: (____)				tel_resid
Telefone celular: (____)				tel_celular
<b>Crítérios exclusão</b>				
Incluído no estudo?	(0) Não	(1) Sim	incluido	
Motivo da exclusão: (0) Diagnóstico duvidoso de doença inflamatória intestinal (1) Internações hospitalares recentes (<30 dias) não relacionadas à DII (2) Doença infecciosa aguda (<7 dias) (3) Neoplasia maligna (4) Recusa				motivo_excl
<b>Idade e sexo</b>				
Idade: _____ anos (completos)				idade
Sexo: (0) Feminino (1) Masculino				genero
<b>Comorbidades (complementar com dados do prontuário) - Você possui algumas destas doenças?</b>				
HAS	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	has
Diabetes Mellitus	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	diabetes
AIDS/HIV	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	hiv
Asma	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	asma
Enfisema ou bronquite crônica (DPOC)	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	d poc
Infarto do miocárdio	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	iam
Angina	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	angina
Derrame (AVC)	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	avc
Colesterol alto	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	dislipidemia
Insuficiência cardíaca congestiva (ICC)	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	icc
Insuficiência renal	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	insuf_renal
Hipotireoidismo	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	hipotir
Osteoporose ou osteopenia	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	osteop
Artrite reumatóide	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	artrite
Lupus	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	lupus

Depressão	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	depressao
Tuberculose	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	Tuberc
<b>Hábitos de vida – Tabagismo ativo (Considerar cigarro industrializado, palheiro)</b>				
O Sr. (a) fuma ou já fumou? (0) Nunca fumei (1) Já fumei, mas parei há mais de 30 dias (2) Ainda fumo			tabagismo	
O Sr. (a) consome bebida alcóolica ou tinha o hábito de beber? (0) Nunca bebi (1) Já bebi, mas parei há mais de 30 dias (2) Ainda bebo				
<b>Medicações (complementar com dados do prontuário)</b> <b>- Atualmente para o tratamento da sua doença inflamatória intestinal, quais medicamentos está em uso regular?</b>				
Sulfassalazina Tempo de uso em meses:	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	sulfassa dose_sulfassa
Mesalazina Tempo de uso em meses:	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	Mesala dose_mesala
Mesalazina supositório Tempo de uso em meses:	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	Mesalakup dose_mesalakup
Azatioprina Tempo de uso em meses:	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	Azatiop dose_azatiop
Infliximabe Tempo de uso em meses:	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	Inflix dose_inflix
Adalimumabe Tempo de uso em meses:	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	Adalimu dose_adalimu
Vedolizumabe Tempo de uso em meses:	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	Vedoli dose_vedoli
Ustequinumabe Tempo de uso em meses:	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	Ustequ dose_ustequ
Prednisona Tempo de uso em meses:	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	Pred dose_pred
Metotrexate Tempo de uso em meses:	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	Metotre dose_metotre
Ferro elementar VO Tempo de uso em meses:	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	Ferro dose_ferro


Ferro endovenoso Tempo de uso em meses:	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	Ferroev dose_ferroev
<b>- Quais outras medicações o senhor fez uso regular nos últimos 30 dias? (anotar os nomes)</b>				
				med1
				med2
				med3
				med4
<b>Doença inflamatória intestinal (complementar com dados do prontuário)</b>				
Diagnóstico estabelecido (1) Doença de Crohn (2) Colite ulcerativa				Diag
Tempo do diagnóstico em anos:				Temp_Diag
Para pacientes com doença de Crohn (Determinar a localização do acometimento de acordo com os resultados de exames endoscópicos ou radiológicos) (0) Íleo terminal – L1 (1) Cólon – L2 (2) Ileocolônica – L3 (3) Trato superior associado – L4				Crohnlocal_diag
Para pacientes com doença de Crohn (Determinar o comportamento da doença de acordo com os resultados de exames endoscópicos, radiológicos, descrição cirúrgicas, exame proctológico ou outros dados em prontuário) (0) Inflamatório – B1 (1) Estenosante – B2 (2) Penetrante – B3 (3) Doença perianal associada – p				Crohnfeno_diag
Para pacientes com colite ulcerativa (Determinar a localização do acometimento de acordo com os resultados de exames endoscópicos ou radiológicos) (0) Proctite (1) Colite esquerda (2) Colite extensa				Rcuilocal_diag
Procedimento cirúrgico já realizado devido à doença inflamatória intestinal (Determinar através do questionamento direto ao paciente ou dados em prontuário) (0) Nenhum (1) Colectomia (2) Ileocolectomia (3) Enterectomia (4) Tratamento proctológico para doença perianal fistulizante (5) Dilatação endoscópica ou estenoplastia				Cx_prev

Internação hospitalar prévia pela doença inflamatória intestinal (Determinar através do questionamento direto ao paciente ou dados em prontuário) (0) Não (1) Sim	int_prev
<b>Exame Físico</b>	
Estado Geral (0) Bom (1) Razoável (2) Ruim	EF_eg
Estatura (cm):	EF_est
Peso (kg) – retirar sapato, cinto, chaves, dentre outros:	EF_peso
Cálculo do IMC:	EF_imc
Pressão arterial sistólica:	EF_pasist
Pressão arterial diastólica:	EF_padiast
Frequência cardíaca:	EF_fc
Temperatura axilar:	EF_temp
Exame físico do abdome:	EF_abd
*Descrever sucintamente e para complementar os escores de atividade	
<b>Avaliação da atividade clínica para pacientes com doença de Crohn Índice de Harvey-Bradshaw – calcular pontuação</b>	
Percepção de bem estar (0) Boa (1) Ligeiramente abaixo do normal (2) Ruim (3) Muito ruim (4) Péssimo	Hb_bemestar
Dor abdominal (0) Ausente (1) Leve (2) Moderada (3) Acentuada	Hb_dor
Número de evacuações líquidas ou pastosas (nas últimas 24 horas) – máximo de 25  Quantidade: _____	Hb_evac
Massa abdominal (0) Ausente (1) Duvidosa (2) Presente (3) Presente e dolorosa	Hb_massa
Complicações extra intestinais (1 ponto para cada manifestação) Artralgia Uveíte Eritema Nodoso	Hb_numcompl



Úlcera aftoide oral Pioderma gangrenoso Fissura anal Fístula nova Abscesso	
Total da pontuação	Hb_total
<b>Avaliação da atividade clínica para pacientes com colite ulcerativa</b> <b>Simple Clinical Colitis Activity Index (SCCAI) – calcular a pontuação</b>	
Frequência evacuatória diurna (0) 0 a 3 (1) 4 a 6 (2) 7 a 9 (3) >9	SCCAI_freq
Frequência evacuatória noturna (0) 0 (1) 1 a 3 (2) 4 a 6	SCCAI_notur
Urgência evacuatória (0) Nenhuma (1) Presente (2) Urgência (3) Incontinência	SCCAI_urg
Presença de sangue nas fezes (0) Nenhuma (1) Traços (2) Ocasional (< 50% das evacuações) (3) Frequentes (>50% das evacuações)	SCCAI_sg
Percepção de bem estar (0) Boa (1) Ligeiramente abaixo do normal (2) Ruim (3) Muito ruim (4) Péssimo	SCCAI_eg
Manifestações extra intestinais (1 ponto para cada manifestação) Artrite Uveíte Eritema nodoso Pioderma gangrenoso	SCCAI_numman
Total da pontuação	SCCAI_total

## ANEXO D – Instrumento para coleta de exames laboratoriais

 UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA HOSPITAL UNIVERSITÁRIO / SUS												<b>REQUISIÇÃO DE EXAMES</b>																							
NOME												Nº DO PRONTUÁRIO																							
IDADE												SEXO						COR						PESO						ALTURA					
AMB <input type="checkbox"/>		EM <input type="checkbox"/>		UTI <input type="checkbox"/>		PED <input type="checkbox"/>		CC <input type="checkbox"/>		GO <input type="checkbox"/>		MÉD <input type="checkbox"/>		SAP <input type="checkbox"/>		LEITO <input type="checkbox"/>																			
DADOS CLÍNICOS: <b>DII</b>																		CARIMBO/AUTORIZAÇÃO																	
MATERIAL A EXAMINAR: <b>Sangue</b>																																			
EXAMES SOLICITADOS: <p style="text-align: center;"><b>Projeto DII</b></p>																																			
																		DATA    /    /																	
																		ASS. E CARIMBO DO MÉDICO																	

COD. 11185 IMPRESA UNIVERSITÁRIA

**ANEXO E – Instrumento para coleta do grupo controle**

<p align="center"><b>Análise da Permeabilidade Intestinal Através de Biomarcador Sérico e sua Correlação com Escores de Atividade Clínica e Proteína C Reativa em Pacientes com Doença Inflamatória Intestinal</b></p> <p align="center"><b>GRUPO CONTROLE</b></p>				
<b>Dados de identificação e contato</b>				
Nome:				nome
Número do prontuário:				num_pront
Data da avaliação: ____/____/____				data_aval
Data de nascimento: ____/____/____				data_nasc
Telefone residencial: (____)				tel_resid
Telefone celular: (____)				tel_celular
<b>Grupo controle</b>				
1. Incluído no estudo? *Maior e igual a 18 anos *TCLE assinado *Ausência de critérios de exclusão	(0) Não	(1) Sim	incluido	
Critérios de exclusão - Diagnóstico de doença inflamatória intestinal - Impossibilidade de compreender o termo de consentimento livre e esclarecido - Internações hospitalares recentes (< 30 dias) por qualquer razão - Doença infecciosa aguda nos últimos 7 dias - Diagnóstico prévio ou em tratamento para neoplasias malignas - Portador de outra doença inflamatória crônica, por exemplo: lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide, espondilite anquilosante, doenças respiratórias (asma ou doença pulmonar obstrutiva crônica), psoríase.				
2. Idade completa em anos: _____				idade_cont
3. Sexo (0) Masculino (1) Feminino				Sexo_gc

**ANEXO F – Artigo submetido à revista Arquivos de Gastroenterologia**

1 *Research Article*

2 **Factors associated with circulating zonulin in inflammatory bowel**  
3 **disease**

4 **Fatores associados com os níveis séricos de zonulina na doença**  
5 **inflamatória intestinal**

6

7 Luiz Augusto Cardoso Lacombe<sup>1,2</sup>, Camila Matiollo<sup>2,3</sup>, Julia Salvan da Rosa Felisberto<sup>4</sup>,  
8 Mariano Felisberto<sup>4</sup>, Eduardo Monguilhott Dalmarco<sup>4</sup>, Leonardo de Lucca Schiavon<sup>1,2</sup>

9

10 1. Department of Internal Medicine, Division of Gastroenterology, Federal  
11 University of Santa Catarina

12 2. Postgraduation program in Medical Sciences, Federal University of Santa  
13 Catarina

14 3. Department of Clinical Analysis, Federal University of Santa Catarina

15 4. Postgraduation program in Pharmacy, Federal University of Santa Catarina

16

17

18 \*Correspondence: luiz\_lacombe@hotmail.com; Phone Number: +55-48-996021109  
19 (L.A.C.L)

20

21 \*Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45 **ABSTRACT**

46

47 **Background:** Inflammatory bowel disease (IBD) comprises the spectrum between Crohn's  
48 disease (CD) and ulcerative colitis (UC), a condition whose prevalence in countries such as Brazil  
49 has increased significantly in recent years. Changes in the intestinal epithelial barrier function  
50 and, consequently, an increase in intestinal permeability, have been suggested as important factors  
51 in the pathogenesis of different autoimmune conditions, including IBD. Therefore, there is a need  
52 for a practical tool to assess gut barrier integrity in these patients.

53 **Objectives:** To study factors associated with serum zonulin levels, a marker of intestinal  
54 permeability, in patients with IBD.

55 **Methods:** This was a cross-sectional observational study that included 117 patients with IBD and  
56 32 healthy controls. Disease activity was assessed by the Simple Clinical Colitis Activity Index  
57 (SCCAI) in UC and by the Harvey-Bradshaw Index (HBI) in CD subjects. Zonulin levels were  
58 measured by ELISA and inflammatory cytokines by Cytometric Bead Array, using commercially  
59 available kits.

60 **Results:** The mean age of IBD patients was  $44.0 \pm 15.9$  years, 66.7% were female, 57 subjects  
61 were diagnosed with CD and 60 with UC. At evaluation, clinical remission was observed in 56.7%  
62 of CD patients and in 59.2% of UC subjects. No differences were observed in zonulin levels when  
63 comparing IBD patients with the control group (95.28 ng/mL vs. 96.61 ng/mL,  $p=0.573$ ) and  
64 when comparing patients with CD to those with UC (79.68 ng/mL vs. 106.10 ng/mL,  $p=0.887$ ).  
65 Among IBD group, zonulin concentrations were higher among females, correlated positively with  
66 body mass index (BMI) and age; and negatively with hemoglobin and hematocrit. In patients with  
67 UC, zonulin correlated negatively with hemoglobin, hematocrit, and albumin; and positively with  
68 BMI and SCCAI. Among CD patients, zonulin was positively correlated with age and BMI, but  
69 not with HBI. No correlations were observed between zonulin and circulating cytokines in IBD  
70 patients.

71 **Conclusions:** in this cohort mostly comprised of patients in clinical remission, serum zonulin  
72 levels were not higher in patients with IBD than healthy controls, and correlated with variables  
73 not linked to baseline disease, such as sex, age and BMI. However, zonulin correlated with  
74 clinical and laboratory parameters of disease severity and activity among subjects with UC, but  
75 not among patients with CD. These findings indicate a potential role for zonulin as a biomarker  
76 in IBD, particularly in UC.

77

78 **Keywords:** inflammatory bowel disease; intestinal permeability; zonulin; inflammatory  
79 cytokines; disease activity.

80

81

82

83

84

85

86

87

88

89

90

91

92

## 93 RESUMO

94

95 **Introdução:** A doença inflamatória intestinal (DII) compreende o espectro entre a doença de  
96 Crohn (DC) e a colite ulcerativa (UC), condição esta cuja prevalência em países como o Brasil  
97 vem aumentando significativamente nos últimos anos. Alterações na função da barreira epitelial  
98 intestinal e, conseqüentemente, um aumento da permeabilidade intestinal, têm sido sugeridos  
99 como fatores importantes envolvidos na patogênese de diferentes condições autoimunes, dentre  
100 elas, a DII. Desta forma, existe a necessidade de uma ferramenta prática para avaliar a integridade  
101 da barreira epitelial nestes pacientes.

102 **Objetivos:** Estudar os fatores associados com os níveis séricos de zonulina, um marcador da  
103 permeabilidade intestinal, em pacientes com DII.

104 **Métodos:** Estudo observacional transversal que incluiu 117 pacientes com DII e 32 indivíduos  
105 que compuseram o grupo controle. A atividade da doença foi avaliada pelo *Simple Clinical*  
106 *Colitis Activity Index* (SCCAI) na UC e pelo índice de Harvey-Bradshaw (IHB) em pacientes com  
107 DC. Os níveis de zonulina foram quantificados por ELISA e os níveis das citocinas inflamatórias  
108 pelo *Cytometric Bead Array*, utilizando kits comercialmente disponíveis.

109 **Resultados:** A média de idade dos pacientes com DII foi de  $44,0 \pm 15,9$  anos, 66,7% eram do  
110 sexo feminino, 57 pacientes eram portadores de DC e 60 pacientes eram portadores de UC. No  
111 momento da avaliação clínico-laboratorial, 56,7% dos pacientes com DC encontravam-se em  
112 remissão clínica e, dentre os pacientes com UC, 59,2% deles assim se encontravam. Não foram  
113 observadas diferenças nos níveis séricos de zonulina entre pacientes com DII e grupo controle  
114 ( $95,28$  ng/mL vs.  $96,61$  ng/mL;  $p=0,573$ ), assim como entre pacientes com DC e pacientes com  
115 UC ( $79,68$  ng/mL vs.  $106,10$  ng/mL,  $p=0,887$ ). Dentre os pacientes com DII, as concentrações  
116 de zonulina foram mais elevadas no sexo feminino e correlacionaram-se positivamente com o  
117 índice de massa corporal (IMC) e com a idade, correlacionando-se negativamente com os níveis  
118 de hemoglobina e hematócrito. Nos pacientes com UC, as concentrações de zonulina  
119 correlacionaram-se negativamente com os parâmetros hemoglobina, hematócrito e albumina e,  
120 positivamente, com o IMC e com o SCCAI. Dentre os pacientes com DC, a zonulina sérica  
121 correlacionou-se positivamente com a idade e com o IMC, mas não com o IHB. Não foram  
122 observadas correlações entre os níveis de zonulina e as citocinas circulantes nos pacientes com  
123 DII.

124 **Conclusões:** Nesta coorte constituída majoritariamente por pacientes em remissão clínica, os  
125 níveis séricos de zonulina não se mostraram aumentados em pacientes com DII em relação a  
126 indivíduos controles e correlacionaram-se com variáveis não relacionadas à doença de base, como  
127 com o sexo, com a idade e com o IMC. No entanto, os níveis séricos de zonulina correlacionaram-  
128 se com parâmetros clínicos e laboratoriais de gravidade e atividade da doença dentre os pacientes  
129 com UC, mas não dentre os pacientes com DC. Estes achados indicam um potencial papel da  
130 zonulina sérica como um biomarcador na DII, principalmente na UC.

131

132 **Palavras-chave:** doença inflamatória intestinal; permeabilidade intestinal; zonulina; citocinas  
133 inflamatórias; atividade da doença.

134

135

136

137

138

139

## 140 INTRODUCTION

141 Inflammatory bowel disease (IBD) comprises the spectrum between ulcerative  
142 colitis (UC) and Crohn's disease (CD). Both are immune-mediated conditions  
143 characterized by chronic intestinal inflammation, being associated with greater morbidity  
144 and mortality and high costs to the health system (1). The pathophysiology of IBD is not  
145 yet fully understood, but genetic, environmental and intrinsic factors related to the  
146 individual with this condition contribute to the development of intestinal inflammation.  
147 Changes in the intestinal epithelial barrier function and, consequently, an increase in  
148 intestinal permeability, have been suggested as important factors in the pathogenesis of  
149 different autoimmune conditions, including IBD (2, 3).

150 The intestinal epithelial barrier separates the external microenvironment from the  
151 deeper layers of the host's mucosa. Thus, the intestinal lumen, which is located close to  
152 the apical region of epithelial cells and contains a variety of macromolecules, bacterial  
153 compounds and antibodies, remains isolated from more internal regions of the organism,  
154 such as the lamina propria. For this to occur, it is necessary the integrity of the epithelial  
155 barrier, a property acquired through cell adhesion that is present through the junctional  
156 complex, composed of the structures tight junctions, adherens junctions and desmosomes.  
157 These protein structures have dynamic properties and influence the ability of the intestinal  
158 epithelium to control the passage of substrates through the paracellular pathway, being  
159 responsible, in part, for the intestinal permeability (4, 5).

160 Zonulin is a 47-kDa molecular weight protein described by Wang et al. which has  
161 the ability to increase intestinal permeability. Its identification was described by studies  
162 that investigated the pathophysiology of *Vibrio cholerae*, and identified a secondary  
163 enterotoxin, called zonula occludens toxin (Zot) and its endogenous homologous, then  
164 called zonulin (6). The mechanism by which zonulin would modulate intestinal  
165 permeability, increasing it, was proposed by Fasano et al. This group proposed that  
166 zonulin would bind to the epidermal growth factor receptor (EGFR), activating it; also,  
167 zonulin would have the ability to activate this receptor through binding to the protease-  
168 activated receptor type 2 (PAR2) (2). The activation of these receptors would culminate  
169 in an intracellular signaling process that results in a decrease in the interaction between  
170 proteins in tight junctions and in an increase in intestinal permeability.

171 A better understanding of the role of intestinal permeability in IBD is needed. The  
172 investigation of a potential biomarker related to increased intestinal permeability and its  
173 relationship with clinical activity and with well-established circulating inflammatory

174 markers, such as C-reactive protein and cytokines, may bring new evidence about the  
175 pathophysiology of IBD. To date, there are few studies that have consistently evaluated  
176 zonulin concentrations in patients with IBD. The role and relevance of the assessment of  
177 zonulin concentrations in the management and follow-up of these patients is also not well  
178 established.

179 The aims of this study were to study serum zonulin concentrations in patients with  
180 IBD and its correlation with clinical indices of disease activity and circulating  
181 inflammatory markers, to compare the serum concentration of zonulin between patients  
182 with IBD and a control group and to compare the serum zonulin concentration according  
183 to the IBD phenotype and also regarding the demographic and clinical characteristics of  
184 IBD.

185

## 186 **METHODS**

### 187 **Ethical Considerations**

188 This study is in accordance with the resolution of the National Health Council No.  
189 196 of 10/10/1996. The protocols for this study were approved by the Ethics and Research  
190 with Human Beings Committee of the Federal University of Santa Catarina (CEPSH-  
191 UFSC) and are registered under the number 2.308.479. The written informed consent  
192 form was read and signed by all patients.

193

### 194 **Patients**

195 This was a cross-sectional observational study that included 117 patients ( $\geq$  18  
196 years of age) with IBD who were under regular follow-up at the Inflammatory Bowel  
197 Disease Outpatient Clinic of the University Hospital of the Federal University of Santa  
198 Catarina, Brazil. All patients were under regular follow-up and had the diagnosis of IBD  
199 established through the combination of clinical, laboratory, radiological, endoscopic and  
200 histological findings. Patients in the following situations were excluded: hospitalization  
201 not related to IBD in the last 30 days, infections in the last 7 days, previous or current  
202 diagnosis of malignant neoplasms, and refusal or inability of the patient to understand the  
203 informed consent.

204 Thirty-two sex- and age-matched healthy subjects served as a control group.  
205 Exclusion criteria for the control group were: hospitalization in the last 30 days, infections  
206 in the last 7 days, diagnosis of any major chronic disease, previous diagnosis of any



207 chronic inflammatory disease, previous or current diagnosis of malignant neoplasms, and  
208 refusal or inability of the patient to understand the informed consent.

209

## 210 **Methods**

### 211 Clinical and demographic variables

212 The variables age, sex, comorbidities, subtype of inflammatory bowel disease (CD  
213 or UC), time since diagnosis, current therapy, current or previous smoking, previous  
214 hospital admissions and surgical history related to IBD, location, and behavior of the IBD  
215 were collected. Each patient also underwent physical examination to obtain variables  
216 such as weight, height, body mass index (BMI), blood pressure, heart rate, axillary  
217 temperature, and abdominal physical examination. Clinical scores to assess disease  
218 activity were then applied to all patients. The Simple Clinical Colitis Activity Index  
219 (SCCAI) was applied for those diagnosed with UC and the Harvey-Bradshaw Index  
220 (HBI) for those diagnosed with CD (7, 8). Patients were classified as being in clinical  
221 remission when SCCAI was  $\leq 2$  for UC or when IHB was  $\leq 4$  for CD (9, 10).

### 222 Routine laboratory tests

223 All subjects underwent peripheral blood collection to perform the routine  
224 laboratory tests (blood count, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase,  
225 gamma glutamyltransferase, alkaline phosphatase and albumin). C-reactive protein  
226 (CRP) levels were measured by the automatic analyzer Dimension RxL Max® (Siemens),  
227 with an analytical sensitivity of 0.5 mg/dL.

### 228 Zonulin levels

229 The tests were performed in serum samples collected after clinical evaluation and  
230 stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Serum zonulin levels were measured by sandwich ELISA using a  
231 commercially available assay (Human Zonulin ELISA Kit - Elabscience®) on samples  
232 collected in conjunction with the routine laboratory tests.

### 233 Circulating cytokine measurements

234 The quantitative determination of circulating cytokines in the serum was  
235 performed using a Cytometric Bead Array (CBA) kit (BD Biosciences®; San Diego, CA).  
236 The fluorescence produced by the CBA beads was measured on a FACSVerse Flow  
237 Cytometer (BD FACSVerse™, San Jose, CA, USA) and analyzed using Software FCAP  
238 Array 3.0 (BD Biosciences). The minimum detection values were 18.9 pg/mL for IL-  
239 17A, 4.5 pg/mL for IL-10, 2.4 pg/mL for IL-6, 4.9 pg/mL for IL-4, 2.6 pg/mL for IL-2,  
240 3.8 pg/mL for TNF, and 3.7 pg/mL for IFN- $\gamma$ .

## 241 Statistical Analyses

242 Normality of the variable distribution was determined using the Kolmogorov-  
243 Smirnov test. The correlation between the numerical variables was evaluated using  
244 Spearman's correlation coefficient. Continuous variables were compared using Student's  
245 t-test in the case of a normal distribution or if not, using the Mann-Whitney test.  
246 Categorical variables were evaluated by the chi-square test or Fisher's exact test, as  
247 appropriate. All tests were performed using SPSS software, version 17.0 (SPSS, Chicago,  
248 IL, USA). A P value of less than 0.05 was considered statistically significant.

249

## 250 RESULTS

### 251 Characteristics of included patients and Zonulin levels in study groups

252 The main characteristics of the patients included in the study are depicted in Table  
253 1. In patients with CD, the most common location of involvement was the terminal ileum  
254 (33%). The most frequent pattern or phenotype of the disease was inflammatory, observed  
255 in 45% of patients. When evaluating the presence or not of clinical activity through the  
256 HBI, more than half of the patients (56.7%) with CD were in clinical remission, defined  
257 as  $HBI \leq 4$ .

258 Regarding UC, the most common pattern of involvement was pancolitis or  
259 extensive colitis (57.1%). As for the assessment of disease activity in patients with UC,  
260 77.2% of them were in clinical remission ( $\leq 3$  daily evacuations and absence of blood in  
261 the stool); when the SCCAI activity score was applied, 59.2% of the patients were in  
262 clinical remission.

263 There were no significant differences in median zonulin levels when comparing  
264 IBD patients with the control group (95.28 ng/mL vs. 96.61 ng/mL,  $p=0.573$ ) (Figure 1).

265

### 266 Serum Zonulin Concentration in all patients with IBD

267 In patients with IBD, zonulin levels were significantly higher among females  
268 when compared to males (126.05 ng/mL vs. 46.65 ng/mL,  $p<0.001$ ). No differences were  
269 observed when comparing patients with CD to those with UC (79.68 ng/mL vs. 106.10  
270 ng/mL,  $p=0.887$ ). Likewise, no differences were noted for zonulin levels according to  
271 history of IBD-related previous surgical procedures (66.62 ng/mL vs. 106.95 ng/mL,  $p=$   
272 0.118) or hospitalizations (90.03 ng/mL vs. 97.63 ng/mL,  $p=0.814$ ).

273 Spearman correlation analysis was performed between serum zonulin  
274 concentrations and demographic, clinical, and laboratory variables (Table 2). In the IBD

275 group as a whole, zonulin was positively correlated with age ( $r_s= 0.184$ ;  $p= 0.047$ ) and  
276 BMI ( $r_s= 0.573$ ;  $p< 0.001$ ). On the other hand, a weak negative correlation was observed  
277 between zonulin and hemoglobin ( $r_s= -0.254$ ;  $p= 0.006$ ) and hematocrit ( $0.252$ ;  $p= 0.006$ ).  
278 No correlations were observed between zonulin and circulating cytokines.

279

#### 280 Serum Zonulin Concentration in patients with UC

281 Regarding the 57 patients with UC, serum zonulin presented a weak negative  
282 correlation with hemoglobin ( $r_s= -0.289$ ;  $p= 0.029$ ), hematocrit ( $r_s= -0.299$ ;  $p= 0.024$ ),  
283 and albumin values ( $r_s= -0.344$ ;  $p= 0.009$ ) (Table 2). Conversely, zonulin levels positively  
284 correlated with BMI ( $r_s= 0.412$ ;  $p= 0.002$ ), CRP ( $r_s= 0.299$ ;  $p= 0.024$ ), and with the  
285 SCCAI clinical activity index ( $r_s= 0.271$ ;  $p= 0.041$ ). No correlations were observed  
286 between zonulin and circulating cytokines in UC patients.

287

#### 288 Serum Zonulin Concentration in patients with CD

289 Among the 60 patients diagnosed with CD, significant positive correlations were  
290 observed between zonulin and age ( $r_s= 0.349$ ;  $p= 0.006$ ) and BMI ( $r_s= 0.679$ ;  $p< 0.001$ )  
291 (Table 2). No significant correlations were observed between zonulin and other studied  
292 variables, including HBI and circulating cytokines.

293

#### 294 DISCUSSION

295 The burden of inflammatory bowel disease is increasing globally and there is a  
296 great need for new tools to help manage these patients. Increased intestinal permeability  
297 is an important event in several chronic inflammatory conditions, and is thought to play  
298 a major role in IBD. Therefore, finding a simple noninvasive test to evaluate gut  
299 permeability might contribute for a better understanding of the disease and lead to an  
300 improvement in clinical management.

301 In the present study we evaluated serum zonulin levels, a marker of intestinal  
302 permeability, in 117 patients with IBD followed at our outpatient clinic. Among patients  
303 with CD, we observed that the most frequently affected location was the terminal ileum  
304 (L1), with 33% of cases. In turn, when the behavior of the disease was evaluated, the most  
305 prevalent was inflammatory (B1), which was observed in 45% of cases. More than half  
306 of the patients with CD (56.6%) were in clinical remission of the disease, demonstrating  
307 an IHB score  $\leq 4$  points. Through these characteristics, we concluded that our sample of  
308 patients with CD consisted mainly of patients with a less severe disease and with a lesser

309 extent of the disease, resulting in a lower score in the disease activity score. On the other  
310 hand, when considering the diagnosis of UC, the pattern of involvement most commonly  
311 found in this series was pancolitis (E3), a finding compatible with the profile of patients  
312 who are expected to be followed up in a tertiary medical center (11).

313 In the present study, no differences in zonulin levels were observed when IBD  
314 patients were compared to controls, and when UC patients were compared to CD. In a  
315 recent study, Caviglia et al. evaluated 118 IBD patients and observed similar zonulin  
316 levels when comparing UC and CD (12). However, contrary to what we observe here, in  
317 the Italian study significantly higher zonulin levels were observed in IBD subjects when  
318 compared to healthy controls (12). This difference can be explained by the distinct  
319 profiles of the cohorts evaluated in both studies. Here, more than half of patients were in  
320 remission in contrast with only 20% in the Italian cohort.

321 When evaluating the IBD group as a whole, a moderate positive correlation was  
322 observed between serum zonulin and BMI. A previous study evaluating one hundred and  
323 twenty-three Caucasian men without IBD demonstrated that zonulin levels increase in  
324 parallel with BMI, waist/hip ratio (an important marker of visceral adiposity and insulin  
325 resistance), fasting insulin concentrations, triglycerides, uric acid, and IL-6  
326 concentrations. On the other hand, zonulin concentrations were negatively correlated with  
327 HDL-cholesterol concentrations and with insulin sensitivity (13). Obesity, per se, seems  
328 to influence intestinal permeability – some studies in animal models have already  
329 demonstrated that a high saturated fat diet results in changes in the intestinal microbiota  
330 and in an increase in intestinal permeability (14). This increase in intestinal permeability,  
331 in turn, contributes to the installation of a low-grade inflammatory state and insulin  
332 resistance (15).

333 Zonulin levels were also positively correlated with age in IBD patients. This  
334 finding is similar to a study including 37 healthy subjects where zonulin levels were 22%  
335 higher among older adults as compared to young ones (16). Although the data is limited,  
336 these findings may indicate intestinal permeability may contribute, at least partially, to  
337 age-related increases in chronic inflammation and associated disorders.

338 When UC patients were evaluated separately, zonulin concentrations correlated  
339 with variables classically associated with disease severity and activity, such as SCCAI  
340 score, CRP, albumin, hemoglobin, and hematocrit concentrations. Such associations were  
341 not observed among patients with CD, as no significant correlations were observed  
342 between zonulin and variables related to IBD severity, including IHB. This result can be

343 attributed to the characteristics of our patients with UC; the most common pattern of  
344 involvement was pancolitis (E3), representing a more extensive and severe disease and,  
345 consequently, more symptomatic. On the other hand, CD is characterized by greater  
346 heterogeneity and, in general, smaller segments of the gastrointestinal tract are affected,  
347 possibly with less impact on intestinal permeability. There are few studies evaluating the  
348 relationship between circulating zonulin levels and clinical activity in IBD. Caviglia et  
349 al. found no correlation between zonulin levels and clinical activity index (12). However,  
350 results were not reported separately for UC and CD. On the other hand, a more recent  
351 study from the same group found that serum zonulin levels were higher among IBD  
352 patients in active phase, although, again, the results were not evaluated according to  
353 disease phenotypes (17).

354 In conclusion, in this cohort mostly comprised of patients in clinical remission or  
355 with well-controlled IBD, zonulin levels were associated with variables not related to the  
356 baseline disease such as sex and BMI. Zonulin also correlated with clinical and laboratory  
357 parameters of disease severity and activity among subjects with UC, but not in CD.  
358 Nonetheless, zonulin was not correlated with circulating cytokines. These findings  
359 indicate a potential role for zonulin as a biomarker in IBD, particularly in UC. However,  
360 the practical utility of this tool may be limited by the interference of factors unrelated to  
361 the underlying disease.

362

#### 363 **ACKNOWLEDGMENTS**

364 We are grateful to Vivian de Souza Menegassi for the support during the  
365 collection of clinical data at Inflammatory Bowel Disease outpatient clinic.

366

367 **Authors' Contribution:** Lacombe LAC: study design, clinical data collection, survey  
368 execution, writing of the text, statistical analysis, approval of the final version of  
369 manuscript. Matiollo C: Blood sample handling, execution of laboratory tests. Felisberto  
370 JSR, Felisberto M, and Dalmarco EM: execution of laboratory tests. Schiavon LL: study  
371 design, survey execution, writing and critical review of text, statistical analysis, approval  
372 of the final version of manuscript.

373

#### 374 **Orcid:**

375 Luiz Augusto Cardoso Lacombe: 0000-0003-2104-1250

376 Camila Matiollo: 0000-0001-6144-6776

377 Julia Salvan da Rosa Felisberto: 0000-0001-9921-9683

378 Mariano Felisberto: 0000-0001-9268-4195

379 Eduardo Monguilhott Dalmarco: 0000-0002-5220-5396

380 Leonardo Lucca Schiavon: 0000-0003-4340-6820

## 381 REFERENCES

382

- 383 1. Windsor JW, Kaplan GG. Evolving Epidemiology of IBD. *Curr Gastroenterol Rep.*  
 384 2019 Jul 23; 21(8):40.
- 385 2. Fasano A. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door  
 386 to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiol Rev.* 2011 Jan; 91(1):151-75.
- 387 3. Sturgeon C, Fasano A. Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier  
 388 functions, and its involvement in chronic inflammatory diseases. *Tissue Barriers.*  
 389 2016 Oct 21; 4(4):e1251384.
- 390 4. Farquhar MG, Palade GE. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol.* 1963  
 391 May; 17(2):375-412.
- 392 5. Odenwald MA, Turner JR. The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target? *Nat*  
 393 *Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017 Jan; 14(1):9-21.
- 394 6. Wang W, Uzzau S, Goldblum SE, Fasano A. Human zonulin, a potential modulator  
 395 of intestinal tight junctions. *J Cell Sci.* 2000 Dec;113 Pt 24:4435-40.
- 396 7. Harvey RF, Bradshaw JM. Methods and devices – A simple index of Crohn’s-disease  
 397 activity. *Lancet.* 1980 Mar; 315(8167): 514.
- 398 8. Walmsley RS, Ayres RC, Pounder RE, Allan RN. A simple clinical colitis activity  
 399 index. *Gut* 1998 Feb; 43:29-32.
- 400 9. Turner D, Seow CH, Greenberg GR, Griffiths AM, Silverberg MS, Steinhart AH. A  
 401 systematic prospective comparison of noninvasive disease activity indices in  
 402 ulcerative colitis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2009 Oct; 10(7):1081-1088.
- 403 10. Best WR. Predicting the Crohn’s disease activity index from de Harvey-Bradshaw  
 404 Index. *Inflamm Bowel Dis* 2006 Apr; 12(4): 304-310.
- 405 11. Gomes TNF, de Azevedo FS, Argollo M, Miszputen SJ, Ambrogini O Jr. Clinical and  
 406 Demographic Profile of Inflammatory Bowel Disease Patients in a Reference Center  
 407 of São Paulo, Brazil. *Clin Exp Gastroenterol.* 2021 Mar; 17(14):91-102.
- 408 12. Caviglia GP, Dughera F, Ribaldone DG, Rosso C, Abate ML, Pellicano R, et al.  
 409 Serum zonulina in patients with inflammatory bowel disease: a pilot study. *Minerva*  
 410 *Med.* 2019 Apr; 110(2):95-100
- 411 13. Moreno-Navarrete JM, Sabater M, Ortega F, Ricart W, Fernández-Real JM.  
 412 Circulating zonulin, a marker of intestinal permeability, is increased in association  
 413 with obesity-associated insulin resistance. *PLoS One.* 2012; 7(5):e37160.
- 414 14. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neytrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes  
 415 in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat  
 416 diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes.* 2008 Jun; 57(6):1470-81.
- 417 15. Genser L, Poitou C, Brot-Laroche É, Rousset M, Vaillant JC, Clément K, et al.  
 418 L’altération de la perméabilité intestinale : chaînon manquant entre dysbiose et  
 419 inflammation au cours de l’obésité? [Alteration of intestinal permeability: the  
 420 missing link between gut microbiota modifications and inflammation in obesity?].  
 421 *Med Sci.* 2016; 32(5):461–9.
- 422 16. Qi Y, Goel R, Kim S, Richards EM, Carter CS, Pepine CJ, et al. Intestinal  
 423 permeability biomarker zonulin is elevated in healthy aging. *J Am Med Dir Assoc.*  
 424 2017 Sep; 18(9): 810.e1-810.e4.

425 17. Caviglia GP, Rosso C, Stalla F, Rizzo M, Massano A, Abate ML, et al. On-treatment  
426 decrease of serum interleukin-6 as a predictor of clinical response to biologic therapy  
427 in patients with inflammatory bowel diseases. *J Clin Med.* 2020 Mar; 9(3):800.  
428  
429  
430  
431  
432  
433  
434  
435  
436  
437  
438  
439  
440  
441  
442  
443  
444  
445  
446  
447  
448  
449  
450  
451  
452  
453  
454  
455  
456  
457  
458  
459  
460  
461  
462  
463  
464  
465  
466  
467  
468  
469  
470  
471  
472  
473  
474

## 475 TABLES

476

477 Table 1 - Characteristics of included patients

478

Variable	Patients (n=117)
Age (years), mean $\pm$ SD	44.0 $\pm$ 15.9
Female, n (%)	78 (66.7)
Diagnosis, n (%)	
Ulcerative Colitis	57 (48.7)
Crohn's Disease	60 (51.3)
Time since diagnosis (years), median	7.0
Comorbidities	
Systemic arterial hypertension, n (%)	27 (23.1)
Dyslipidemia, n (%)	18 (15.4)
Depression, n (%)	14 (12.0)
Bone metabolism disease, n (%)	12 (10.3)
Diabetes, n (%)	10 (8.5)
Primary sclerosing cholangitis, n (%)	3 (2.6)
Active alcohol consumption, n (%)	36 (30.8)
Current smoking, n (%)	5 (4.3)
Previous smoking, n (%)	46 (39.3)
Previous surgery, n (%)	19 (16.2)
BMI, mean $\pm$ SD	26,7 $\pm$ 5.6
Laboratory evaluation	
Hemoglobin (mg/dL), median	13.1
Hematócrito (%), median	39.6
CRP (mg/dL), median	3.2
Albumin (g/dL), median	3.8
Zonulin (ng/mL), median	95.28
TNF (pg/mL), median	6.17
IFN- $\gamma$ (pg/mL), median	14.53
IL-17A (pg/mL), median	26.38
IL-10 (pg/mL), median	7.44
IL-6 (pg/mL), median	7.70
IL-4 (pg/mL), median	15.74
IL-2 (pg/mL), median	10.32

479 SD, standard deviation; BMI, body mass index; CRP, C-reactive protein; TNF, tumor necrosis factor; IFN- $\gamma$ , gamma-  
480 interferon; IL-17A, interleukin 17A; IL-10, interleukin 10; IL-6, interleukin 6; IL-4, interleukin 4; IL-2, interleukin 2.

481

482

483



484 Table 2 - Correlation between serum zonulin concentration and the variables age, body  
 485 mass index, and laboratory parameters in patients with inflammatory bowel disease.  
 486

Variable	IBD		UC		CD	
	Zonulin		Zonulin		Zonulin	
	<i>r<sub>s</sub></i>	<i>p</i>	<i>r<sub>s</sub></i>	<i>p</i>	<i>r<sub>s</sub></i>	<i>p</i>
Age	0.184	0.047	-0.003	0.981	0.349	0.006
BMI	0.573	< 0.001	0.412	0.002	0.679	<0.001
Hemoglobin	-0.254	0.006	-0.289	0.029	-0.223	0.087
Hematocrit	-0.252	0.006	-0.299	0.024	-0.227	0.081
CRP	0.142	0.126	0.299	0.024	0.016	0.903
Albumin	-0.179	0.054	-0.344	0.009	-0.042	0.750
TNF	-0,084	0,374	-0,001	0,994	-0,164	0,216
IFN- $\gamma$	-0,042	0,657	0,016	0,905	-0,075	0,573
IL-17A	0,155	0,100	0,195	0,153	-0,114	0,391
IL-10	-0,066	0,486	-0,032	0,816	-0,102	0,443
IL-6	0,047	0,617	0,160	0,245	-0,045	0,738
IL-4	-0,116	0,219	-0,046	0,738	-0,121	0,360
IL-2	-0,116	0,220	-0,061	0,658	-0,169	0,200
SCCAI	-	-	0.271	0.041	-	-
HBI	-	-	-	-	0.108	0.412

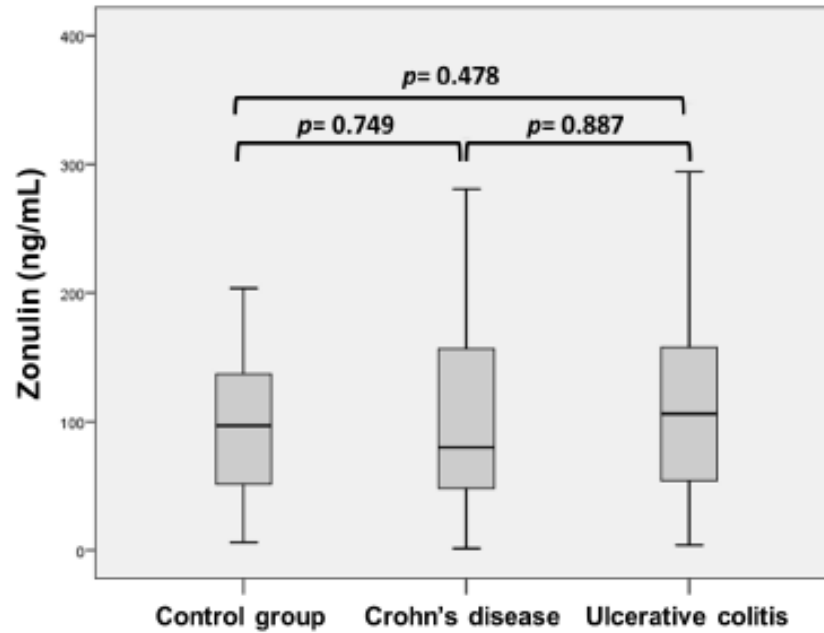
487 IBD, inflammatory bowel disease; UC, ulcerative colitis; CD, Crohn's disease; BMI, body mass index; SCCAI, *Simple*  
 488 *Clinical Colitis Activity Index*; HBI, Harvey-Bradshaw index; CRP, C-reactive protein; TNF, Tumor Necrosis Factor  
 489 alpha; IFN, interferon; IL, interleukin; SCCAI, *Simple Clinical Colitis Activity Index*; HBI, Harvey-Bradshaw index.  
 490  
 491  
 492  
 493  
 494  
 495  
 496  
 497  
 498  
 499  
 500  
 501  
 502  
 503  
 504  
 505  
 506  
 507  
 508  
 509  
 510  
 511

512 **FIGURE**

513

514 Fig. 1 – Comparison of serum zonulin levels according to study groups. No differences  
515 were observed when comparing control group with Crohn's disease patients ( $p= 0.749$ )  
516 and with ulcerative colitis group ( $p= 0.478$ ). Likewise, zonulin levels were similar in both  
517 groups with IBD ( $p= 0.887$ ).

518



519