

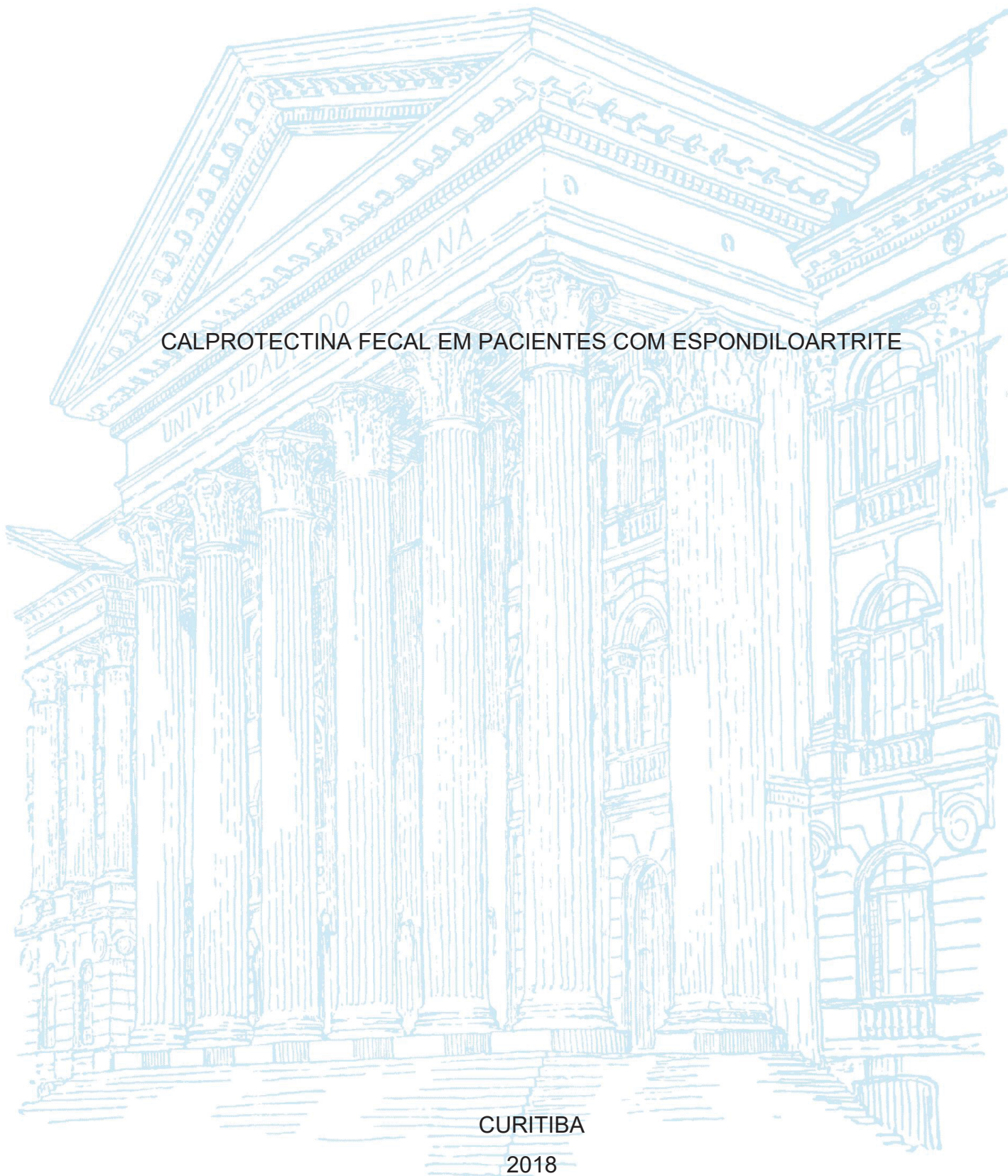
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA SIMIONI

CALPROTECTINA FECAL EM PACIENTES COM ESPONDILOARTRITE

CURITIBA

2018



JULIANA SIMIONI

CALPROTECTINA FECAL EM PACIENTES COM ESPONDILOARTRITE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Medicina Interna.

Orientadora: Profa. Dra. Iara José de Taborda Messias-Reason

Coorientador: Prof. Dr. Renato Mitsunori Nisihara

CURITIBA

2018

S589 Simioni, Juliana

Calprotectina fecal em pacientes com espondiloartrite [recurso eletrônico] / Juliana Simioni, – Curitiba, 2018.

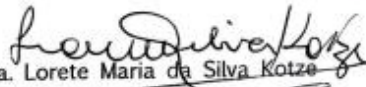
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Iara José de Taborda Messias-Reason
Coorientador: Prof. Dr. Renato Mitsunori Nishihara

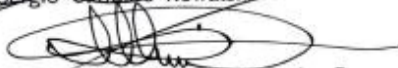
1. Complexo antígeno L1 leucocitário. 2. Espondilite anquilosante. 3. Espondiloartrite. 4. Doenças inflamatórias intestinais. I. Reason, Iara José de Taborda Messias. II. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

PARECER

Aos vinte e oito dias do mês de março do ano de dois mil e dezoito, a banca examinadora constituída pelos Professores: **Dra. Lorete Maria da Silva Kotze (PUC-PR)**, **Dr. Sérgio Candido Kowalski (Depto. de Clínica Médica/UFPR)** e **Dra. Iara José de Taborda Messias-Reason (Depto. de Anatomia Patológica/UFPR e orientadora)**, exarou o presente parecer sobre a dissertação de mestrado elaborada por **JULIANA SIMIONI**, aluna concluinte do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna – Mestrado e Doutorado da Universidade Federal do Paraná, intitulada: **"CALPROTECTINA FECAL EM PACIENTES COM ESPONDILOARTRITE"**. A Banca examinadora considerou que a aluna apresentou trabalho adequado para dissertação, e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas de modo a merecer a sua **aprovação**, sendo recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de **Mestre em Medicina Interna e Ciências da Saúde**. A banca considerou o trabalho de grande relevância à Saúde Pública, e recomendam a publicação de artigo em revista técnico-científica com corpo editorial depois de incorporadas às sugestões apresentadas no decurso das arguições, cumpridas outras exigências previstas em normativas da pós-graduação.


Dra. Lorete Maria da Silva Kotze


Dr. Sérgio Candido Kowalski


Dra. Iara José de Taborda Messias-Reason

Aos meus pais, que souberam criar de forma brilhante um ambiente de amor, cuidado e inspiração. Ao meu irmão e primo Naudé, que junto com a família e amigos fazem com que a vida seja uma generosa expressão de alegria. Aos meus amigos e professores, que considero verdadeiras preciosidades que encontrei pelo caminho, especialmente à Dra. Thelma, por despertar em nós o desejo em aprender e compartilhar o conhecimento adquirido.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Iara José de Taborda Messias-Reason, por ter aceitado ser a orientadora deste trabalho.

À professora Dra. Thelma Skare, por ser uma grande fonte de inspiração, por sua generosa disponibilidade, paciência e por sua dedicação a este trabalho.

Ao professor Dr. Renato Mitsunori Nisihara por ter sido fundamental na escolha do tema e por sua valiosa contribuição e participação neste estudo.

À professora Dra. Ana Paula Beckhauser de Campos, por ter compartilhado as alegrias e dificuldades em todo o processo e por ter me convidado a fazer parte do ambulatório das espondiloartrites.

Ao professor Dr. Sérgio Ioshii, por ter enriquecido este trabalho através da análise das lâminas dos materiais das biópsias intestinais.

Aos endoscopistas Dra. Susan Takata, Dr. Henrique Invitti e Dr. Carlos Naufel, por terem se disponibilizado a realizar os exames de ileocolonosopia.

Aos pacientes, à enfermeira Ana Paula Guimarães, à residente Betania Longo e a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para este trabalho colocando nele um pouco de si.

Ao Programa de Pós-graduação da Medicina Interna da Universidade Federal do Paraná pelo aprendizado.

Por fim, aos meus professores e à banca avaliadora por sua disponibilidade em avaliar esta dissertação.

“De fato, os homens começaram a filosofar, agora como na origem, por causa da
admiração.”

(ARISTÓTELES)

RESUMO

Fundamentação: A inflamação intestinal está intimamente relacionada com a fisiopatologia das Espondiloartrites (SpA). A calprotectina fecal, uma proteína citosólica importante liberada durante a ativação de neutrófilos, tem sido usada para medir o grau de inflamação intestinal. O fenótipo da SpA pode mudar de acordo com a população estudada, enfatizando a importância dos estudos locais. Objetivo: Estudar os níveis de calprotectina fecal em uma amostra de SpA em pacientes brasileiros e sua relação com variáveis epidemiológicas, clínicas e de tratamento, bem como com o grau macro e microscópico de inflamação intestinal. Métodos: Foram estudados 85 pacientes com SpA para as características epidemiológicas e clínicas, índices funcionais e inflamatórios e níveis de calprotectina fecal medidos por ELISA (Bühlmann, Basel, Switzerland). Colonoscopia com biópsias intestinais (íleo terminal, ascendente do cólon, transversal e descendente e reto) foi realizada em 39 deles. No momento da colonoscopia, uma segunda dosagem de calprotectina foi feita após a suspensão, de pelo menos 4 semanas, de drogas anti-inflamatórias não esteroidais usadas (AINEs). Resultados: Em 24/85 (28,2%) dos pacientes, a calprotectina fecal foi $<50 \mu\text{g/g}$; em 43/85 (50,5%) os valores estavam entre 50 e $200 \mu\text{g/g}$ e em 18/85 foram $> 200 \mu\text{g/g}$. Na análise univariada, os níveis de calprotectina fecal foram maiores nos pacientes com espondilite anquilosante ($p < 0,0001$), em indivíduos com envolvimento axial ($p = 0,002$) e naqueles com uveíte ($p = 0,04$); foi menor nos com envolvimento da pele ($p = 0,0004$). Nenhuma associação foi encontrada dos valores da calprotectina com parâmetros inflamatórios e funcionais da SpA, queixas gastrointestinais, presença de HLA B27 e medicamentos usados (todos $p = \text{ns}$). O estudo de regressão múltipla mostrou que apenas o diagnóstico de SpA e envolvimento axial foi associado independentemente com níveis de calprotectina. Após a suspensão de AINEs, observou-se uma queda nos níveis de calprotectina fecal (de valores medianos de $215,0 \mu\text{g/g}$ para $76,0 \mu\text{g/g}$; $p = 0,01$). Na colonoscopia, 33,3% dos pacientes apresentaram sinais macroscópicos de inflamação e esses pacientes apresentaram maior valor de calprotectina do que outros ($p = 0,009$). O exame microscópico mostrou que todos os pacientes apresentavam infiltrado linfoplasmocítico e infiltrado eosinofílico; a erosão epitelial esteve presente em 27,2% e 92,5% apresentaram hiperplasia linfoide. Conclusões: Pacientes com espondilite anquilosante e formas axiais da doença têm níveis mais altos de calprotectina do que as demais formas de SpA. Indivíduos com todos os tipos de SpA apresentam alterações inflamatórias microscópicas no intestino.

Palavras-chave: Calprotectina fecal. Intestino. Inflamação. Espondiloartrite. Espondilite anquilosante.

ABSTRACT

Background: Gut inflammation is closely related to Spondyloarthritis (SpA) pathophysiology. Fecal calprotectin, a major cytosolic protein released during neutrophils activation, has been used to measure the degree of gut inflammation. The phenotype of SpA may change according to studied population stressing the importance of local studies. **Aim:** To study the fecal calprotectin levels in a sample of SpA in Brazilian patients and its relationship with epidemiological, clinical and treatment variables as well as with the macro and microscopic degree of gut inflammation. **Methods:** Eighty-five SpA patients were studied for epidemiological and clinical features, functional and inflammatory indexes and fecal calprotectin levels measured by Bühlmann (Basel, Switzerland) ELISA kit. Colonoscopy with intestinal biopsies (terminal ileum, colon ascendant, transverse and descendent and rectum) were done in 39 of them. At time of colonoscopy, a second calprotectin level was done after suspension of, at least, 4 weeks of used anti-inflammatory nonsteroidal drugs (NSAIDs). **Results:** In 24/85 (28.2%) of the patients, the fecal calprotectin was $<50 \mu\text{g/g}$; in 43/85 (50.5%) the values were between 50 and $200 \mu\text{g/g}$ and in 18/85 were $>200 \mu\text{g/g}$. In univariate analysis fecal calprotectin levels were higher in Ankylosing Spondylitis patients ($p<0.0001$) and in those with axial involvement ($p=0.002$) and uveitis ($p= 0.04$); it was lower in those with skin involvement ($p=0.0004$). No relationship was found with SpA inflammatory and functional parameters, gastrointestinal complaints, presence of HLA B27 and used medications (all $p=ns$). Multiple regression study showed that only the diagnosis of SpA and axial involvement were independently associated with levels of calprotectin. After suspension of NSAIDs, a drop in fecal calprotectin levels was observed (from median levels of $215.0 \mu\text{g/g}$ to $76.0 \mu\text{g/g}$; $p=0.01$). In the colonoscopy, 33.3% had macroscopic signs of inflammation and these patients had higher calprotectin ($p=0.009$) than others. Microscopic examination showed that all patients had lymphoplasmacytic infiltrate and eosinophilic infiltrate; epithelial erosion was present in 27.2% and 92.5% had lymphoid hyperplasia. **Conclusions:** Patients with ankylosing spondylitis and axial forms of diseases have higher calprotectin levels and that patients with all types of SpA have microscopic inflammatory changes in the gut.

Keywords: Fecal calprotectin. Gut. Inflammation. Spondyloarthritis. Ankylosing Spondylitis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	A: ACHADOS ENDOSCÓPICOS NA COLITE ULCERATIVA: PERDA DO DESENHO VASCULAR NA MUCOSA, INFLAMAÇÃO DIFUSA E FRIABILIDADE; B: ACHADOS HISTOLÓGICOS DA RETOCOLITE MOSTRANDO OS ABSCESSOS EM CRIPTA	22
FIGURA 2	A: ACHADOS MACROSCÓPICOS À ILEOCOLONOSCOPIA EM DOENÇA DE CROHN; B: ACHADOS HISTOLÓGICOS NA DOENÇA DE CROHN COM DESTAQUE PARA GRANULOMA	24
FIGURA 3	ESTRUTURA DA CALPROTECTINA	26
FIGURA 4	ESQUEMA DO DESENHO DO ESTUDO	33
FIGURA 5	ACHADOS HISTOLÓGICOS DE BIÓPSIA DE MUCOSA INTESTINAL DE PACIENTE COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE	51
FIGURA 6	MICROFOTOGRAFIAS DE BIÓPSIAS DE INTESTINO DE PACIENTE COM ARTRITE PSORIÁSICA	52
FIGURA 7	ACHADOS HISTOLÓGICOS DE BIÓPSIA DE MUCOSA INTESTINAL DE PACIENTE COM ARTRITE PSORIÁSICA	53

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	PREVALÊNCIA DAS DIFERENTES FORMAS DE ESPONDILOARTRITES DA AMOSTRA ESTUDADA (N=85)	35
GRÁFICO 2	CATEGORIZAÇÃO DOS VALORES DE CALPROTECTINA FECAL NA AMOSTRA ESTUDADA	37
GRÁFICO 3	VALORES DE CALPROTECTINA FECAL DE ACORDO COM O SUBTIPO DE ESPONDILOARTRITE	38
GRÁFICO 4	CALPROTECTINA FECAL DE ACORDO COM O LOCAL DE ENVOLVIMENTO MUSCULOESQUELÉTICO	39
GRÁFICO 5	PRINCIPAIS ACHADOS MACROSCÓPICOS DAS COLONOSCOPIAS (N=39)	44

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	PERFIL CLÍNICO DOS 85 PACIENTES COM ESPONDILOARTRITE ESTUDADOS	36
TABELA 2	USO DE MEDICAMENTOS PELA POPULAÇÃO DE ESPONDILOARTRITE ESTUDADA (N=85)	37
TABELA 3	ANÁLISE DOS VALORES DE CALPROTECTINA FECAL DE ACORDO COM RAÇA, HLA B27 E MANIFESTAÇÕES EXTRA ARTICULARES (MANN WHITNEY)	40
TABELA 4	ESTUDO DE CORRELAÇÃO DA CALPROTECTINA FECAL COM DADOS EPIDEMIOLÓGICOS, ÍNDICE DE MASSA CORPORAL, DADOS DE LABORATÓRIO E ÍNDICES METROLÓGICOS	40
TABELA 5	ESTUDO DOS VALORES DE CALPROTECTINA FECAL DE ACORDO COM USO DE MEDICAMENTOS	41
TABELA 6	NÍVEIS DE CALPROTECTINA FECAL DE ACORDO COM PRESENÇA OU NÃO DE QUEIXAS GASTRINTESTINAIS	43
TABELA 7	ESTUDO DOS NÍVEIS DE CALPROTECTINA FECAL DE ACORDO COM ACHADOS ILEOCOLONOSCÓPICOS (N=25)	45
TABELA 8	ANÁLISE DESCRITIVA DOS ACHADOS MICROSCÓPICOS DE BIÓPSIA INTESTINAL RELEVANTES PARA O ESTUDO OBTIDOS POR COLONOSCOPIA (N=27) EM ÍLEO E COLON ASCENDENTE	46
TABELA 9	ANÁLISE DESCRITIVA DOS ACHADOS MICROSCÓPICOS DE BIÓPSIA INTESTINAL RELEVANTES PARA O ESTUDO OBTIDOS POR COLONOSCOPIA (N=27) EM CÓLON ASCENDENTE E TRANSVERSO.....	46
TABELA 10	ANÁLISE DESCRITIVA DOS ACHADOS MICROSCÓPICOS DE BIÓPSIA INTESTINAL RELEVANTES PARA O ESTUDO OBTIDOS POR ILEOCOLONOSCOPIA (N=27) EM CÓLON DESCENDENTE E RETO	47
TABELA 11	PRESENÇA DE ACHADOS HISTOLÓGICOS EM QUALQUER DOS SEGMENTOS INTESTINAIS ESTUDADOS	49

TABELA 12	PRINCIPAIS ACHADOS HISTOLÓGICOS SEGUNDO A LOCALIZAÇÃO INTESTINAL	49
-----------	--	----

LISTA DE SIGLAS

AINHs	– Anti-inflamatórios não hormonais
ARE	– Artrite relacionada à entesite
ASAS	– Assessment of SpondyloArthritis international Society
ASDAS OCR	– Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score usando PCR
ASDAS-VHS	– Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score usando VHS
ASQoL	– Ankylosing Spondylitis quality of life questionnaire
BASDAI	– Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index
BASFI	– Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index
BASMI	– Bath Ankylosing Spondylitis Metric Index.
CF	– Calprotectina fecal
DII	– Doença inflamatória intestinal
EA	– Espondilite anquilosante
EpA	– Espondiloartrites
EVA	– Escala visual analógica
HEG	– Hospital Erasto Gaertner
HLA	– Antígeno de histocompatibilidade
HUEC	– Hospital Universitário Evangélico de Curitiba
IL	– Interleucinas
MASES	– Maastricht Ankylosing Spondylitis Enthesitis Score
PCR	– Proteína C reativa
TCLE	– Termo de Consentimento livre e esclarecido
TNF	– Fator de necrose tumoral
UFPR	– Universidade Federal do Paraná
VHS	– Velocidade de hemossedimentação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	CONTEXTO E PROBLEMA	16
1.2	OBJETIVOS	17
1.2.1	OBJETIVO GERAL	17
1.2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	ESPONDILOARTRITES	19
2.2	ACOMETIMENTO INTESTINAL NAS ESPONDILOARTRITES	21
2.2.1	INFECÇÕES INTESTINAIS E SINTOMAS ARTICULARES	21
2.2.2	ASSOCIAÇÃO DE ESPONDILOARTRITE E DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL	21
2.2.2.1	RETOCOLITE ULCERATIVA	22
2.2.2.2	DOENÇA DE CROHN	23
2.2.3	INFLAMAÇÃO INTESTINAL SUBCLÍNICA NAS ESPONDILOARTRITES	24
2.3	CALPROTECTINA FECAL	25
2.3.1	CALPROTECTINA FECAL NAS ESPONDILOARTRITES	27
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	28
3.1	CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO	28
3.2	ASPECTOS ÉTICOS	28
3.3	AMOSTRA DO ESTUDO	28
3.4	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	29
3.5	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	29
3.6	CASUÍSTICA	29
3.7	COLETA DE DADOS E DESENHO DO ESTUDO	29
3.7.1	MÉTODO DE DOSAGEM DA CALPROTECTINA FECAL	31
3.7.2	ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS BIÓPSIAS DE MUCOSA INTESTINAL .	32
3.8	METODOLOGIA ESTATÍSTICA	33

4	RESULTADOS	35
4.1	ESTUDO DOS VALORES DE CALPROTECTINA FECAL DE ACORDO COM AS VARIÁVEIS CLÍNICAS	38
4.2	ESTUDO DOS ACHADOS ILEOCOLONOSCÓPICOS E SUAS ASSOCIAÇÕES COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E CALPROTECTINA FECAL	43
5	DISCUSSÃO	54
6	CONCLUSÕES	57
	REFERÊNCIAS	58
	ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	63
	ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	65
	ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO PARA ILEOCOLONOSCOPIA	67
	ANEXO D – BASDAI	69
	ANEXO E – BASFI	70
	ANEXO F – BASMI	71
	ANEXO G – ASQOL	72
	ANEXO H – PROTOCOLO DE ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	73
	ANEXO I – ARTIGO PUBLICADO	75

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTO E PROBLEMA

As espondiloartrites (EpA) são um grupo heterogêneo de doenças inflamatórias crônicas que podem afetar tanto o esqueleto axial quanto periférico e apresentar em seu espectro clínico o envolvimento de outros órgãos que se reflete em manifestações como uveíte, psoríase e doença inflamatória intestinal. Fazem parte desta entidade doenças como artrite reativa, artrite psoriásica, alguns tipos de artrite idiopática juvenil, assim como a espondiloartrite indiferenciada, a artrite associada a doença inflamatória intestinal (DII) e a espondilite anquilosante (EA), que é a mais frequente e o protótipo deste grupo de doenças. Inflamação do esqueleto axial e periférico com neoformação óssea levando a anquilose e associação genética com HLA B27 são características que distinguem as EpAs entre as doenças reumatológicas (DOUGADOS; BAETEN, 2011; BAETEN, 2013).

A doença tem uma prevalência semelhante à da artrite reumatoide, de cerca de 1% da população variando conforme a prevalência local do HLA B27 (AKKOC, 2008, REVEILLE, 2012; STOLWIJK et al., 2012). Afeta predominantemente a população jovem. Tais características somadas a seu caráter de comprometimento articular potencialmente debilitante, faz com que esta doença acarrete relevante morbidade ao indivíduo acometido e gere um negativo impacto socioeconômico (FABREGUE et al., 2012; MICHELSEN et al., 2015).

O envolvimento intestinal nas EpAs tem sido extensamente estudado. Dados apontam para o fato que cerca de 50% destes pacientes podem apresentar inflamação intestinal sem ter sintomas gastrointestinais (CURVELIER et al., 1987; MIELANTS et al., 1995 a; VAN PRAET et al., 2013). O achado de inflamação microscópica intestinal nas EpAs é um fator de risco para doença ativa, está associado a maior inflamação axial e progressão estrutural, e maior risco de desenvolvimento de doença de Crohn (VAN PRAET et al., 2013), fatores que podem caracterizar doença mais grave. Tais achados sugerem que a inflamação intestinal pode ter um papel relevante não só na manifestação clínica, como também na etiopatogenia desta doença e deve ser considerada no contexto de decisão terapêutica.

Pelo fato de se tratar de indivíduos sem sintomas intestinais, o rastreio torna-se um desafio por atualmente envolver o exame de ileocolonoscopia, um exame invasivo, muitas vezes de acesso restrito e dispendioso.

A calprotectina fecal (CF) é um biomarcador de inflamação intestinal e seu uso está bem estabelecido nas doenças inflamatórias intestinais (MATZKIES, 2012). Kotze et al. (2015) demonstrou através da avaliação de pacientes brasileiros que a determinação da calprotectina fecal é uma ferramenta útil na diferenciação entre doença inflamatória intestinal ativa e inativa assim como entre estas e a síndrome do intestino irritável, o que está em concordância com literatura mundial (WAUGHT, 2013; WALKER, 2018). Nas EpAs, trabalhos têm demonstrado que este marcador pode ser útil na identificação de pacientes com inflamação intestinal subclínica (KLINGBERG et al., 2012; CYPERS et al., 2016).

As EpAs são um grupo heterogêneo de doenças que acometem diversos sistemas. O uso de biomarcadores não invasivos, tornam mais fácil a identificação dos pacientes sob maior risco de inflamação intestinal. Além disso, evita submeter indivíduos à ileocolonoscopia, que é um exame invasivo, caro e frequentemente de difícil acesso. Até o momento, são escassos os estudos que tenham avaliado a inflamação intestinal em pacientes brasileiros com EpA. Por este motivo apresentamos o seguinte estudo.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o uso da calprotectina fecal na identificação de inflamação intestinal em pacientes com EpA.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a correlação entre níveis de calprotectina fecal com parâmetros de atividade de doença

Avaliar a correlação de níveis de calprotectina fecal com manifestações clínicas e uso de medicações

Avaliar a correlação de níveis de calprotectina fecal com achados histopatológicos

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ESPONDILOARTRITES

As espondiloartrites formam um grupo de doenças inflamatórias que compartilham manifestações clínicas, mecanismos imunopatológicos e associação a marcadores genéticos, como ao antígeno de histocompatibilidade classe I, HLA B27. O comprometimento musculoesquelético abrange a sacroilíte, espondilite, artrite, dactilite e entesite (pontos de inserção de músculos e tendões na estrutura óssea) (DOUGADOS; BAETEN, 2011; VAN TUBERGEN, 2015), sendo este último sinal clínico, entesite, recentemente considerado como chave no desencadeamento da doença (SCHETT et al., 2017).

Faz parte do espectro clínico das EpA a presença de manifestações extra-articulares que se expressam como uveíte, psoríase e doença inflamatória intestinal. Uveíte ocorre em cerca de 25 a 30% dos pacientes, psoríase em cerca de 10 a 25% e doença inflamatória intestinal entre 5 e 10% (VAN TUBERGEN, WEBER, 2012).

As doenças que compõe esta entidade são a artrite reativa, artrite psoriásica, algumas formas de artrite idiopática juvenil que são chamadas artrites relacionadas a entesite, artrite associada a doença inflamatória intestinal, espondilite anquilosante e espondiloartrite indiferenciada. Estas subdivisões respeitam o fato que embora sejam doenças relacionadas, têm apresentações fenotípicas distintas (DOUGADOS; BAETEN, 2011).

Moll et al. (1974) propuseram o termo espondiloartropatias soronegativas, atualmente chamadas espondiloartrites, para referir-se a um grupo de doenças que se caracterizavam pela ausência do fator reumatoide. É importante separar as EpAs da artrite reumatoide, pois apresentam diferenças não só quanto a clínica articular como extra-articular, fisiopatologia, componentes imunológicos envolvidos, resposta terapêutica e prognóstico.

A etiopatogenia das espondiloartrites envolve fatores ambientais e fatores genéticos com características muitas vezes semelhantes a outras doenças inflamatórias autoimunes, como é o caso das doenças inflamatórias intestinais. Um exemplo é o polimorfismo do gene CARD 15 que está associado a um risco maior de desenvolver doença de Crohn e é considerado preditor de DII em pacientes com

espondiloartrites e sacroilíte em pacientes com doença de Crohn. Outro fator genético bastante estudado é o HLA B27, cuja associação, embora reconhecida ainda não é completamente compreendida. Outros componentes genéticos incluem genes do ERAP-1, do receptor de IL- 23 e do receptor da IL-6, da IL-12B (SCHIOTIS et al., 2008).

A espondilite anquilosante é a doença mais prevalente e mais estudada deste grupo. Utiliza-se como critério classificatório o critério de Nova Iorque Modificado proposto por van der Linden et al. (1984). Este critério exige ao menos um critério clínico de sinal ou sintoma axial e um critério radiográfico, caracterizado por sacroilíte visualizado em exame de radiografia, exame de imagem disponível até então.

Após o surgimento de medicações com potencial para impactar positivamente na evolução da doença por melhorar a sintomatologia, função e qualidade de vida dos pacientes, fez-se necessário a elaboração de critérios classificatórios que possibilitassem a detecção da doença em fase precoce.

Em 2009, a Sociedade Internacional de Avaliação das Espondiloartrites, referida como grupo ASAS, propôs novos critérios classificatórios para as EpAs, subdividindo-as conforme a manifestação articular predominante. Neste contexto, surgiram os termos EpA axial, em que o sintoma determinante é a dorsalgia e EpA periférica, quando a artrite, entesite e/ou dactilite são os sintomas preponderantes (RUDWALEIT et al., 2009, 2011).

Uma das características importantes da nova classificação, chamados critérios ASAS para EpA, foi que passou a se considerar alterações inflamatórias em articulações sacroilíacas detectadas pelo método de imagem de ressonância nuclear magnética. Tais lesões, em sua evolução, podem progredir para alterações estruturais vistas em exame radiológico, porém estes refletem achados mais tardios da doença. Foi então que se possibilitou a identificação de pacientes em fase precoce de doença. Criou-se o termo espondiloartrite axial não radiográfica (EpA ax nr) para se referir aos pacientes que não apresentavam alterações significativas em exames radiológicos das articulações sacroilíacas, mas apresentavam características clínicas, laboratoriais e/ou sinais sugestivos da doença na ressonância magnética de sacroilíacas.

As opções de tratamento incluem anti-inflamatórios não hormonais (AINHs), sulfassalazina, imunossupressores como metotrexate, leflunomida e ciclosporina e medicamentos biológicos como os anti TNF- α (adalimumabe, infliximabe, certolizumabe pegol, golimumabe e etanercept), inibidores das interleucinas (IL) 12 e 23 e inibidores da IL17. A decisão terapêutica deve incluir a avaliação de atividade de doença tanto articular quanto extra articular, sendo importante considerar manifestações como uveíte, psoríase e doença inflamatória intestinal, pois a repercussão terapêutica em cada sistema é diferente (ELEWAUT; MATUCCI-CERINIC, 2009; VAN DER HEIJDE et al. 2017).

Estudar as espondiloartrites é de suma importância. Esta é uma doença grave com potencial para evoluir com anquilose das articulações da coluna de tal maneira que o seu portador pode tornar-se rígido e incapaz de realizar movimentos necessários para atividades cotidianas. Além disso, esta doença causa dor músculo esquelética que pode ser intensa e incapacitante. Em seu espectro clínico, pode envolver outros órgãos como olhos, pele e intestino, trazendo ainda mais repercussões negativas na vida do paciente acometido (MICHELSEN et al., 2015). Por afetar predominantemente indivíduos jovens, tem também um relevante impacto socioeconômico (MARTINDALE et al., 2015).

2.2 ACOMETIMENTO INTESTINAL NAS ESPONDILOARTRITES

2.2.1 INFECÇÕES INTESTINAIS E SINTOMAS ARTICULARES

O eixo entre intestino e articulação começou a ser considerada no contexto das EpA ao se observar que pacientes geneticamente predispostos, como aqueles com HLA B27 presente, evoluíam com artrite periférica após infecções gastrointestinais por bactérias como *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella sp.*, e *Campylobacter jejuni*, formando o quadro clínico que conhecemos por artrite reativa (CURVELIER et al., 1987; GARCÍA-KUTZBACH et al., 2018.)

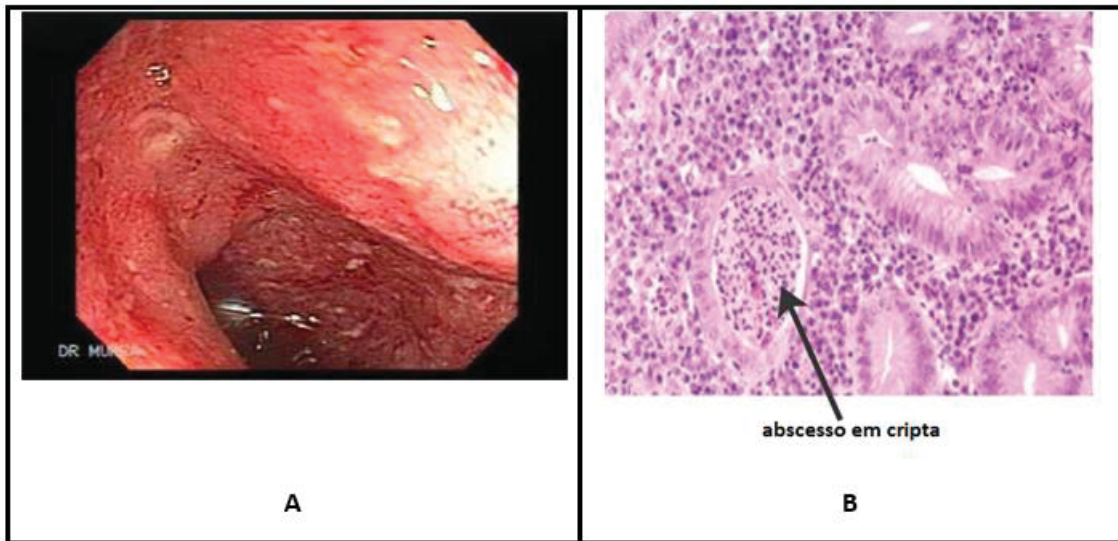
2.2.2 ASSOCIAÇÃO DE ESPONDILOARTRITE E DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são representadas pela doença de Crohn e colite e/ou retocolite ulcerativa. Ambas se caracterizam por serem doenças inflamatórias crônicas que afetam predominantemente adultos jovens. Fatores como predisposição genética, fatores ambientais, desequilíbrio do sistema imune têm um papel no desenvolvimento da doença. O diagnóstico é realizado através de sinais clínicos, métodos endoscópicos e histologia (TORRES et al., 2016; UNGARO et al., 2016).

2.2.2.1 RETOCOLITE ULCERATIVA

A retocolite ulcerativa apresenta-se com sintomas clínicos como diarreia sanguinolenta e tenesmo. Achados endoscópicos incluem lesões erosivas e úlceras. Acomete do reto ao cólon proximal, estando limitada a este segmento. Pode ser dividida em inflamação do reto (proctite ulcerativa), inflamação limitada ao cólon esquerdo (colite a esquerda) e a pancolite ou colite extensa. Quanto maior o envolvimento do cólon, pior o prognóstico, tendo o paciente maior risco de desenvolver câncer colorretal (HOMMES; VAN DEVENTER, 2004). Achados endoscópicos compreendem friabilidade da mucosa e erosão. A histologia demonstra inflamação aguda e crônica, contínua do reto ao cólon proximal, e a colite ativa é definida pela presença de neutrófilos nas criptas, podendo formar abscesso nestas estruturas. A cronicidade é caracterizada por expansão da superfície basal com células plasmáticas e linfocíticas distorcendo a arquitetura (WRIGHT; WATKINSON, 1959). A FIGURA 1 ilustra os achados endoscópicos e histológicos da colite ulcerativa.

FIGURA 1 – A: ACHADOS ENDOSCÓPICOS NA COLITE ULCERATIVA: PERDA DO DESENHO VASCULAR NA MUCOSA, INFLAMAÇÃO DIFUSA E FRIABILIDADE; B: ACHADOS HISTOLÓGICOS DA RETOCOLITE MOSTRANDO OS ABSCESSOS EM CRIPTA

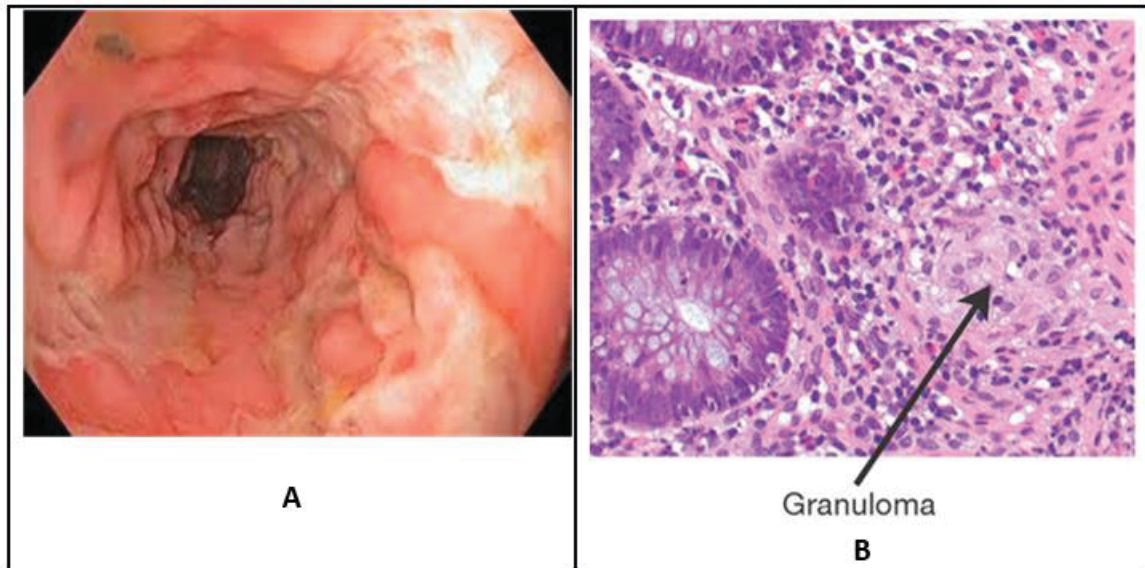


FONTE: Hanauer, 2013.

2.2.2.2 DOENÇA DE CROHN

A doença de Crohn pode apresentar-se com sintomatologia de diarreia não sanguinolenta, dor abdominal, fístula perianal, obstipação. Pode acometer da boca até o ânus sendo o íleo terminal a porção mais acometida. O tabagismo ativo influencia a atividade da doença. Achados endoscópicos englobam erosões, lesões segmentares serpiginosas, ulcerações profundas, fístulas e estenoses. Algo que a difere da retocolite é o acometimento do intestino delgado. A histologia pode mostrar inflamação transmural e agregado linfocítico, lesões com distribuição segmentar com áreas de mucosa normal. A histologia evidenciando granuloma não caseoso está presente de 30 a 50% dos pacientes e é patognomônico de doença de Crohn (GREENSTEIN; JANOWITZ; SACHAR, 1976). A FIGURA 2 ilustra os achados endoscópicos e histológicos da doença de Crohn.

FIGURA 2 – A: ACHADOS MACROSCÓPICOS À ILEOCOLONOSCOPIA EM DOENÇA DE CROHN;
 B: ACHADOS HISTOLÓGICOS NA DOENÇA DE CROHN COM DESTAQUE PARA GRANULOMA



FONTE: COLONOSCOPIES, [201-].

2.2.3 INFLAMAÇÃO INTESTINAL SUBCLÍNICA NAS ESPONDILOARTRITES

Há cerca de 30 anos, estudos pioneiros evidenciaram que cerca de dois terços de pacientes com EpA apresentavam inflamação intestinal microscópica sem apresentar sintomas gastrointestinais. Os achados histológicos podiam ser divididos em dois grupos de acordo com as características morfológicas e não com tempo de duração de doença, sendo eles achados inflamatórios agudos (histologicamente caracterizados por predomínio de neutrófilos semelhante a enterocolite bacteriana) e achados de inflamação crônica, muito semelhante em sua histologia ao padrão de doença de Crohn inicial (JACQUES; ELEWAUT, 2008).

Estudos mais recentes confirmaram estes achados, tendo sido encontrado inflamação intestinal em 50% dos pacientes, sendo cerca de 30% com achados de inflamação crônica (VAN PRAET et al., 2013). É importante ressaltar que, além destes achados de inflamação crônica poderem ser considerados uma fase inicial de doença de Crohn, estes pacientes têm maior risco para evoluir clinicamente com doença inflamatória intestinal. Cerca de 20% dos pacientes com estes achados evoluem com doença de Crohn num período de 5 anos (MIELANTS et al., 1995 b).

Um modelo de transição de inflamação intestinal de caráter agudo para crônico foi proposto com intuito de chamar atenção para uma possível janela

terapêutica nesta fase considerando as células estromais que parecem ser pivotais neste contexto (VAN PRAET et al., 2012).

O fato de esta população de pacientes portadores de EpA usarem frequentemente medicações que podem potencialmente impactar na inflamação intestinal gera dúvidas se este achado não seria um evento relacionado a seu uso. Porém, quando comparado pacientes que estavam em uso de AINhs com pacientes que não estavam expostos a medicação, não houve diferença entre os grupos considerando a inflamação intestinal microscópica (MIELANTS et al., 1991). Além disso, embora muitos estudos retrospectivos tenham sido realizados com intuito de esclarecer o papel que o uso de AINhs teria precipitado recidiva de DII, alguns mostram não haver associação enquanto outros relatam recidiva de sintomas após exposição a medicação (JACQUES; ELEWAUT, 2008).

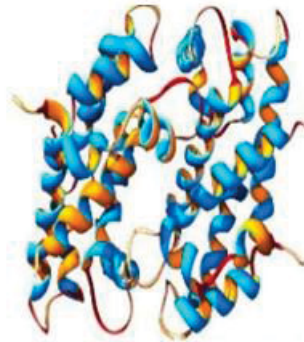
Estudos demonstram que pacientes com EpA que apresentam inflamação intestinal têm maior risco de desenvolver doença de Crohn, assim como evoluir para a forma radiográfica, espondilite anquilosante, podendo representar um pior prognóstico (DE VOS et al., 1996; TURINA et al., 2014). Um estudo recente utilizando um método de imagem, ressonância magnética, para quantificar atividade inflamatória apontou para o fato que os pacientes com inflamação intestinal microscópica apresentam áreas mais extensas de edema medular ósseo nas articulações sacroilíacas, reforçando a ligação existente entre inflamação intestinal e progressão de doença nas EpA axiais (VAN PRAET et al., 2014).

A alteração na mucosa intestinal com um aumento de células inflamatórias, principalmente neutrófilos, correlaciona as espondiloartrites à doença inflamatória intestinal e o influxo de calprotectina fecal na mucosa pode ser um marcador de inflamação intestinal nestes pacientes (CYPERS et al., 2016).

2.3 CALPROTECTINA FECAL

Calprotectina é uma proteína ligadora de cálcio e zinco, pertencente à família das proteínas S100. Apresenta uma conformação heterodimérica composta pelas subunidades S100A8, também chamada proteína 8 mielóide-relacionada (MRP- 8) e S100A9 (MRP-14), conforme FIGURA 3.

FIGURA 3 – ESTRUTURA DA CALPROTECTINA



FONTE: Campos, 2013.

Está presente predominantemente no citoplasma de neutrófilos, compondo 60% das proteínas solúveis deste grupo de células, podendo também ser encontrada em outras células fagocíticas em níveis menos expressivos. Na mucosa intestinal é liberada em fase inicial de resposta inflamatória e pode ser considerada um marcador de migração de neutrófilos. Em ambiente extracelular tem efeito pro inflamatório através de mecanismos dependentes de receptores Toll-like 4, sendo considerada um marcador de ativação de sistema imune inato (VOGL et al., 2007; HSU et al., 2009).

A calprotectina fecal é um biomarcador altamente resistente a degradação por bactérias, enzimas pancreáticas e proteases intestinais. É uma molécula estável nas fezes podendo permanecer em temperatura ambiente por cerca de 1 semana. Sua dosagem pode ser considerada uma medida quantitativa de fluxo de neutrófilos no intestino sendo um marcador que reflete a inflamação intestinal, porém de caráter inespecífico (BJARNASON, 2017).

Diversos fatores podem alterar os níveis de calprotectina fecal desde condições clínicas como infecção gastrointestinal, câncer colorretal, até mesmo uso de medicações como anti-inflamatórios não hormonais (AINHs) e inibidores de bomba de próton (IBP) (MENDALL et al., 2016).

No contexto das doenças inflamatórias intestinais, tem seu papel estabelecido no diagnóstico diferencial entre DII e síndrome do intestino irritável (TIBBLE et al., 2000; KONIKOFF, DENSON, 2012; WAUGHT et al., 2013; KOTZE et al., 2015; WALKER, 2018), assim como no monitoramento de atividade de doença apresentando uma boa correlação com achados endoscópicos (MAK et al., 2018;

LIN et al., 2014). Pode também ser útil como ferramenta de estratificação de pacientes com maior risco de recidiva de atividade de doença (BURRY, 2014).

2.3.1 CALPROTECTINA FECAL NAS ESPONDILOARTRITES

Estudos que avaliaram CF em pacientes com EpA são escassos e em sua maioria envolvem apenas pacientes com espondilite anquilosante e não o espectro todo das EpAs.

Klingberg et al. (2012) demonstrou que dois terços dos pacientes com EA apresentam elevação dos níveis de CF (valores acima de 50mg/kg) sem associação com sintomas de trato gastrointestinal. Neste estudo, níveis mais altos de CF foram associados com maior idade, maior tempo de duração de doença, velocidade de hemossedimentação (VHS), proteína C reativa (PCR) e calprotectina sérica assim como em usuários de AINHS, salicilatos e IBP's. Por outro lado, níveis mais baixos em usuários de metotrexate e infliximabe. O mesmo grupo demonstrou através de um estudo prospectivo que a CF estava associada a atividade de doença e que este marcador se mostrou um importante preditor de doença de Crohn neste grupo de pacientes (KLINGBER, 2017).

Outro estudo demonstrou que 41% dos pacientes classificados como EA apresentaram elevação (valores acima de 50 micro $\mu\text{g/g}$) na dosagem de CF e estes pacientes também apresentaram maiores valores de anticorpos relacionados a DII como anticorpos anti-Saccharomyces cerevisiae IgG e IgA (MATZKIES, 2012).

Cypers et al. (2016) avaliou se a CF poderia ser usada, associada a dosagem de calprotectina sérica e PCR, na identificação de pacientes com EpA e os resultados mostraram que a CF pode ser um bom preditor de inflamação intestinal em pacientes com EpA.

3 CASUISTICA E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no Ambulatório de Reumatologia do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba (HUEC), PR, nos Serviços de Endoscopia Digestiva dos Hospitais Universitário Evangélico de Curitiba (HUEC) e Erasto Gaertner (HEG) e no Laboratório de Patologia da Universidade Federal do PR (UFPR).

3.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo transversal observacional realizado em dois tempos. Num primeiro tempo foram recrutados pacientes do Ambulatório de Reumatologia do HUEC com diagnóstico de Espondiloartrite para obtenção de dados clínicos e amostra de fezes para dosagem de calprotectina fecal. Num segundo momento os pacientes com dosagens de calprotectina fecal alterada, sintomas gastrointestinais ou indicação de rastreamento de câncer colorretal foram convidados a realizar ileocoloscopia com biópsia de mucosa intestinal para análise histopatológica. Neste segundo momento, os pacientes tiveram uma segunda dosagem de calprotectina em amostra fecal.

3.2 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Sociedade Evangélica Beneficente de Curitiba sob parecer nº 1262921 de 06/10/2015 (ANEXO A). Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido para inclusão no trabalho (ANEXO B). Por ocasião da realização da ileocoloscopia, um segundo termo de consentimento foi obtido (ANEXO C).

3.3 AMOSTRA DO ESTUDO

Amostra de conveniência que inclui todos os pacientes com Espondiloartrite do Ambulatório de Reumatologia do HUEC que compareceram para consultas de

rotina no período de dois anos e que concordaram em participar do trabalho de pesquisa. O total incluído foi de 85 pacientes.

3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Incluíram-se pacientes de ambos os sexos, acima de 18 anos, que preenchiam os critérios ASAS (*Assessment of SpondyloArthritis International Society*) de classificação de espondiloartrite axial e periférica (RUDWALEIT et al., 2009, 2011) e que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido ou TCLE (ANEXO A).

3.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Excluíram-se pacientes intelectualmente incapazes de compreender o TCLE, mulheres grávidas, pacientes com diagnóstico prévio de doença inflamatória intestinal ou com qualquer outra doença inflamatória do sistema digestório.

3.6 CASUÍSTICA

Incluíram-se 85 pacientes, de ambos os sexos, com diagnóstico de espondiloartrite. Destes 39 concordaram com a realização de ileocolonosopia. Material para biopsia intestinal suficiente para análise foi obtido em 27 pacientes.

3.7 COLETA DE DADOS E DESENHO DO ESTUDO

Em todos os pacientes incluídos no estudo foram obtidos os seguintes dados por revisão de prontuário ou questionamento direto:

- a) Epidemiológicos: sexo, idade, perfil étnico; tabagismo.
- b) Clínicos: tipo de espondiloartrite, forma de envolvimento (axial vs periférico), tempo de doença, presença de manifestações extra articulares (uveíte e manifestações cutâneas); presença de HLA B27, presença de queixas gastrintestinais e medicamentos em uso.

c) Índices metrológicos: A atividade da espondiloartrite foi medida pelos instrumentos BASDAI, ASDAS VHS e ASDAS PCR.

O BASDAI (ou Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index) é um questionário no qual são aplicadas 6 perguntas acerca de dor e rigidez matinal sendo obtido um escore que vai de zero (nenhuma atividade) a 10 (atividade máxima). Valores acima de 4,0 são considerados de atividade alta (ANEXO D). (SIEPER et al., 2009).

O ASDAS-VHS é calculado levando-se em consideração escala visual analógica (EVA) em que 0= sem sintomas e 10= pior cenário, das articulações periféricas, EVA de estado geral dado pelo paciente; EVA de sintomas axiais; EVA de rigidez matinal e valores de velocidade de hemossedimentação (VHS). Valores <1.3 marcam doença inativa, entre 1.3 e <2.1, atividade moderada, entre 2.1 e > 3.5, atividade alta e >3.5, atividade muito alta.

O ASDAS-PCR é calculado usando os mesmos itens do ASDAS-VHS. porém substituindo-se o VHS pelo PCR ou proteína C reativa. Valores <1.3 marcam doença inativa, entre 1.3 e <2.1, atividade moderada, entre 2.1 e > 3.5, atividade alta e >3.5, atividade muito alta.

O cálculo do ASDAS VHS e do PCR foi feito com auxílio de calculadora *on line* fornecida de Sociedade ASAS, disponível em <https://www.asas-group.org/education/clinical-instruments/asdas-calculator/>.

O índice funcional do paciente foi medido pelo BASFI (*Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index*) que é um questionário com 10 questões acerca de realização de tarefas diárias. Cada uma é graduada de 0-10. O escore total é obtido pela média aritmética das respostas individuais, sendo 0 o melhor e 10 o pior cenário (ANEXO E) (SIEPER et al., 2009).

A qualidade de vida foi medida pelo ASQoL (*Ankylosing Spondylitis Quality of Life questionnaire*) que é um questionário com 18 questões acerca de atividades físicas, sociais e acerca do humor do paciente, respondidas como sim ou não. Sua somatória vai de 0-18 sendo 0 o melhor e 18 o pior escore (ANEXO F).

A atividade de inflamação em enteses foi acessada pelo MASES (*Maastricht Ankylosing Spondylitis Enthesitis Score*) no qual é avaliada a dor ou sensibilidade em 13 sítios de inserção de tendões. Os valores vão de 0 a 13, sendo 0=ausência

de entesites e 13- igual à entesites em todos os sítios (HEUFT-DORENBOSCH et al., 2003).

Por fim, foi obtido o BASMI (*Bath Ankylosing Spondylitis Metric Index*) que é uma média aritmética de valores atribuídos às médias de avaliação da distância tragus-parede, índice de Schober, rotação cervical, distância inter-maleolar, flexibilidade torácica lateral. Seus valores vão de 0 até 10 sendo 0 o melhor índice e 10 o pior (SIEPER et al., 2009).

Todos os instrumentos aplicados foram traduzidos e validados para a língua portuguesa (CUSMANICH, 2006; SHINJO et al., 2007; FERRAZ et al., 1990).

d) Exames laboratoriais: foram obtidos os resultados de VHS, PCR e hemograma, os quais fazem parte da rotina de acompanhamento destes pacientes.

Por ocasião da inclusão todos os pacientes forneceram amostra de fezes para dosagem de calprotectina fecal. Esta amostra foi estocada em refrigerador (0 a +4°C) até a extração da calprotectina e dosagem dela.

Todos os pacientes foram convidados a realizar colonoscopia com biópsia de mucosa gastrointestinal. Cerca de 39 pacientes aceitaram realizar o procedimento. Por ocasião da colonoscopia foi colhida uma segunda amostra de fezes para nova dosagem de calprotectina simultânea com o exame. Ao ser realizada a ileocolonoscopia o paciente deveria ter suspenso uso de anti-inflamatórios não hormonais (AINHs) por, pelo menos, 3 semanas.

Após o devido preparo, as ileocolonoscopias foram realizadas sob sedação com propofol ou midazolam em dois centros de endoscopia digestiva: o do HUEC e o do HEG. Foram obtidas biópsias de íleo terminal, cólon ascendente, cólon transverso, cólon descendente e reto. Alterações macroscópicas foram descritas pelos endoscopistas. As amostras obtidas foram preservadas em formol até serem feitos blocos com parafina para análise histológica.

3.7.1 MÉTODO DE DOSAGEM DA CALPROTECTINA FECAL

As amostras fecais foram testadas usando um kit Bühlmann (Basileia, Suíça) ELISA. Realiza-se um procedimento de extração utilizando 50 mg de fezes e 2,5 g/mL de tampão de extração (B-CAL-EX), e aplicada com uma diluição final de

1:500. Em seguida, os extratos foram incubados com um tampão de reação e misturados a nanopartículas de poliestireno revestidas com anticorpos específicos da calprotectina (imunopartículas). A calprotectina da amostra realiza a aglutinação das imunopartículas. Através da absorvância de luz, mede-se a turbidez da amostra, a qual aumenta com a formação do complexo calprotectina-imunopartícula. A absorção de luz detectada permite a quantificação da concentração da calprotectina por meio de interpolação em uma curva padrão de calibração estabelecida.

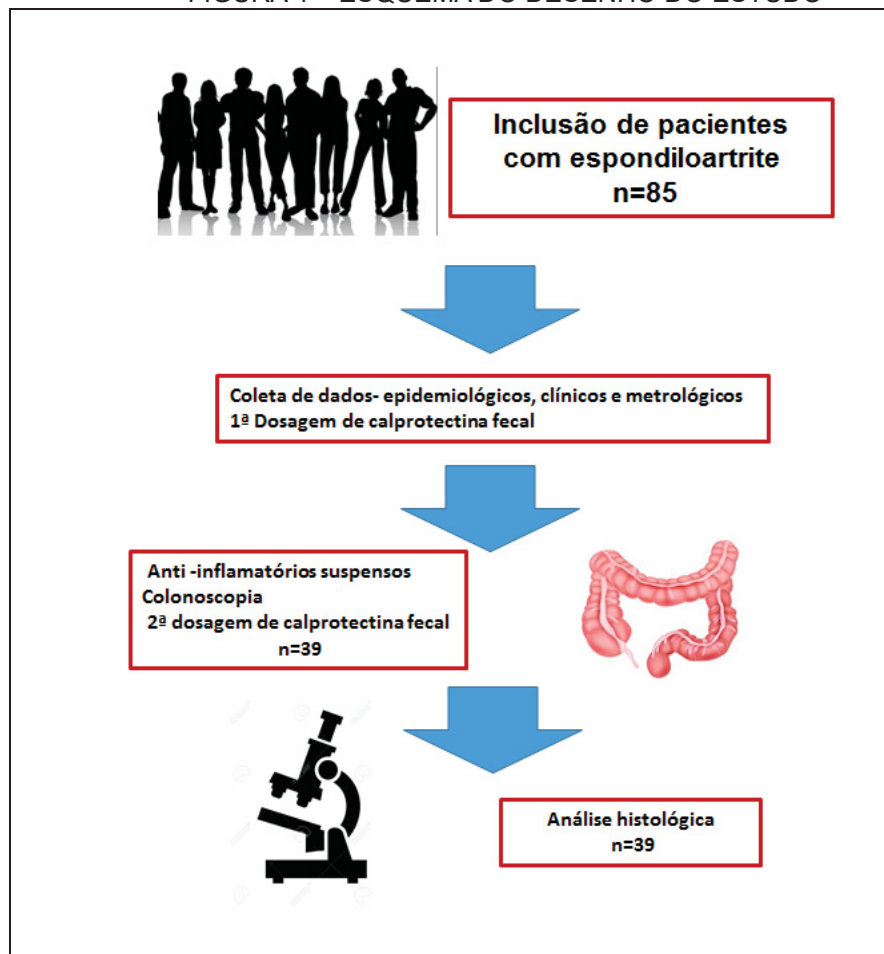
Valores abaixo de 50 µg/g não são indicativos de inflamação no trato gastrointestinal. Níveis entre 50-200 µg/g são considerados indeterminado e sugestivo de repetir a medição e realização de novas investigações. Valores superiores a 200 µg/g são indicativos de doença orgânica com inflamação ativa do trato gastrointestinal.

3.7.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS BIÓPSIAS DE MUCOSA INTESTINAL

A partir dos blocos de parafina foram retirados cortes histológicos medindo 4µm, montados em lâminas sinalizadas e corados com hematoxilina eosina (HE). As leituras foram feitas por um único patologista, o qual se encontrava cego para os achados clínicos e ileocolonoscópicos. Observou-se um protocolo de coleta de dados da histologia (ANEXO H) no qual constavam: integridade da mucosa, presença de erosões epiteliais; presença, intensidade e localização de infiltrado linfoplasmocitário; presença e intensidade de infiltrado eosinofílico, presença ou ausência de hiperplasia linfoide e de granulomas epitelióides. Para maiores detalhes, verifique o Anexo H.

O desenho do estudo encontra-se resumido na FIGURA 4.

FIGURA 4 – ESQUEMA DO DESENHO DO ESTUDO



FONTE: a autora

3.8 METODOLOGIA ESTATÍSTICA

Os dados foram coletados em tabelas de frequência e de contingência. A distribuição dos dados foi julgada pelo teste de Shapiro-Wilk e as medidas de tendência central foram expressas em média e desvio padrão se distribuição normal e mediana e intervalos interquartis se a distribuição for não paramétrica.

A comparação dos dados numéricos foi feita pelo teste de Mann Whitney (duas amostras) e Kruskal Wallis (três amostras). Comparação de dados numéricos foi feita pelos testes de Fisher e de Qui-quadrado. Correlações foram feitas pelo teste de Spearman.

Como os valores de calprotectina fecal estavam associados com presença de mais do que uma variável clínica em análise univariada foi feita análise por regressão múltipla para análise da independência delas.

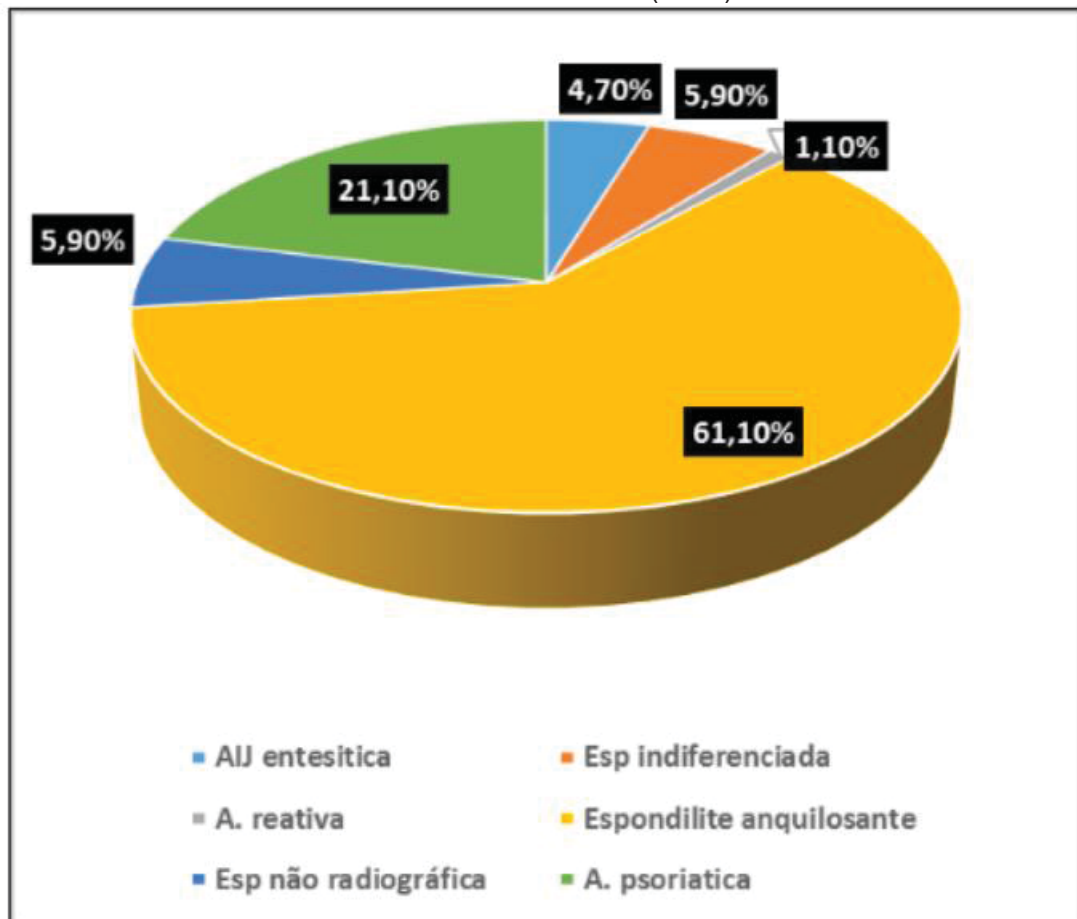
A significância adotada de 5%. Os cálculos foram feitos com auxílio do software Medcalc® versão 10.0.

4 RESULTADOS

Dos 85 pacientes incluídos, eram 55/85 homens (64,7%) e 30/85 (35,2%) eram mulheres com idade de 21 a 87 ano (média de 49.3 ± 11.9 anos) e duração de doença de 1 a 45 anos (mediana de 14; IIQ=8-25 anos).

Nesta amostra, 40/85 (47,0%) não eram tabagistas, 26/85 (30,5%) eram ex tabagistas e 19/85 (22,3%) eram tabagistas atuais. Cerca de 65/85 (76,4 %) eram caucasianos e 20/85 (23,5%) afrodescendentes (negros e pardos). A distribuição quanto ao tipo de espondiloartrite encontra-se no GRÁFICO 1.

GRÁFICO 1 – PREVALÊNCIA DAS DIFERENTES FORMAS DE ESPONDILOARTRITES DA AMOSTRA ESTUDADA (N=85)



FONTE: a autora

Nota: Esp=espondiloartrite; A.=artrite; AIJ=artrite idiopática juvenil.

Os dados clínicos da amostra estudada estão na TABELA 1.

TABELA 1 – PERFIL CLÍNICO DOS 85 PACIENTES COM ESPONDILOARTRITE ESTUDADOS

	N ou intervalo	% ou tendência central
Índice de massa corporal (Kg/m ²)	17,6-43,2	28,2 ±4,8
Forma clínica		
Axial	36/85	42,3%
Periférica	10/85	11,7%
Mista	39/85	45,8%
Manifestações extra articulares		
Uveíte	28/85	32,5%
Pele	18/85	21,1%
HLA B27		
Ausente	20/65	30,7%
Presente	45/65	69,2%
Hemoglobina (g/dL)	10-14,1	14,4 (12,7-15,2)
Leucócitos (mm ³)	1 291-12 370	6 983±2 228
Plaquetas (mm ³)	20 000- 440 000	230 000 (189 000-266 000)
VHS (mm)	1-94	23,5 (9,5-40,0)
PCR (mg/dL)	0-69,0	8,0(2,8-20,0)
ASDAS VHS	0,25-5,25	2,68±1,18
ASDAS PCR	0,19-4,85	2,51±1,02
BASDAI	0-8,6	2,4(1,6-4,3)
BASMI	0-10	4,5(2,6-6,0)
MASES	0-13	0 (0-4,0)
BASFI	0-9,5	5,1(2,5-7,2)
ASQoL	2,00-17,00	9,15±4,78
HAQ	0,00-2,38	0,99±0,66

FONTE: a autora, 2018.

Nota: IIQ=intervalo interquartil; VHS=velocidade de hemossedimentação; PCR= Proteína C reativa; ASDAS= Ankylosing Spondylitis disease Activity Score; BASDAI=Bath Ankylosing Spondylitis index; BASMI=Bath Ankylosing Spondylitis metrological index MASES=Maastricht Ankylosing Spondylitis Score; BASFI= Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index; ASQoL= Ankylosing Spondylitis quality of life questionnaire; HAQ=health assessment questionnaire

Os medicamentos em uso por esta população encontram-se descritos na TABELA 2.

TABELA 2 – USO DE MEDICAMENTOS PELA POPULAÇÃO DE ESPONDILOARTRITE ESTUDADA (N=85)

Uso de anti-inflamatórios não hormonais			
	Por demanda	5/85	5,8%
	Contínuo	22/85	25,8%
Glicocorticoides	Dose 5-20mg/dia prednisona	4/85	4,7%
DMARDS			
	Sulfassalazina	8/85	9,4%
	Metotrexato	16/85	18,8%
	Leflunomida	4/85	4,7%
Medicação Biológica			
Anti TNF α		38/85	44,7%
Bloqueador de receptor	Etanercept	15/85	17,6%
Anticorpo monoclonal	Infliximabe	5/85	5,8%
	Adalimumabe	16/85	18,8%
	Certolizumabe	1/85	1,2%
	Golimumabe	1/85	1,2%
Bloqueador de bomba de próton		41/85	48,2%

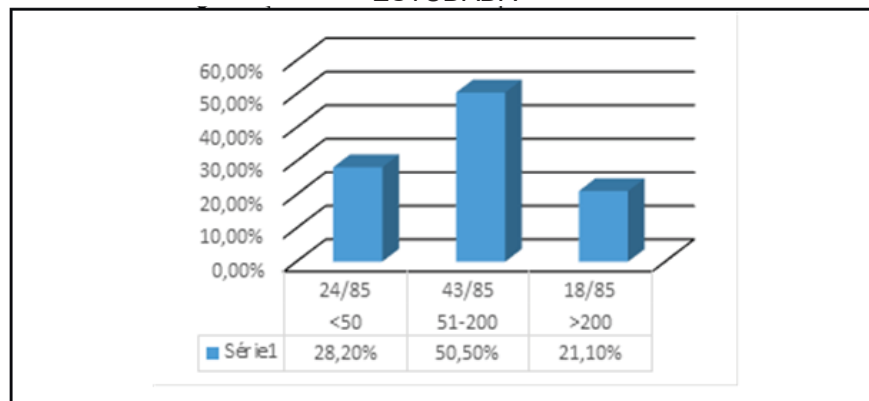
FONTE: a autora, 2018.

DMARDS= Drogas modificadoras de atividade da doença.

O tempo de uso da medicação anti-TNF α variou de 1 a 70 meses (mediana de 20,00; IIQ=7,0-41,5).

Na amostra assim constituída a calprotectina variou de 18 a 1346 μ g/g (mediana de 92,0; IIQ=48,0-183,0 μ g/g). A classificação dos valores de resultado da calprotectina encontra-se no GRÁFICO 2. Cerca de 61/85 (71.7%) tinham calprotectina acima de 50 μ g/g.

GRÁFICO 2 – CATEGORIZAÇÃO DOS VALORES DE CALPROTECTINA FECAL NA AMOSTRA ESTUDADA



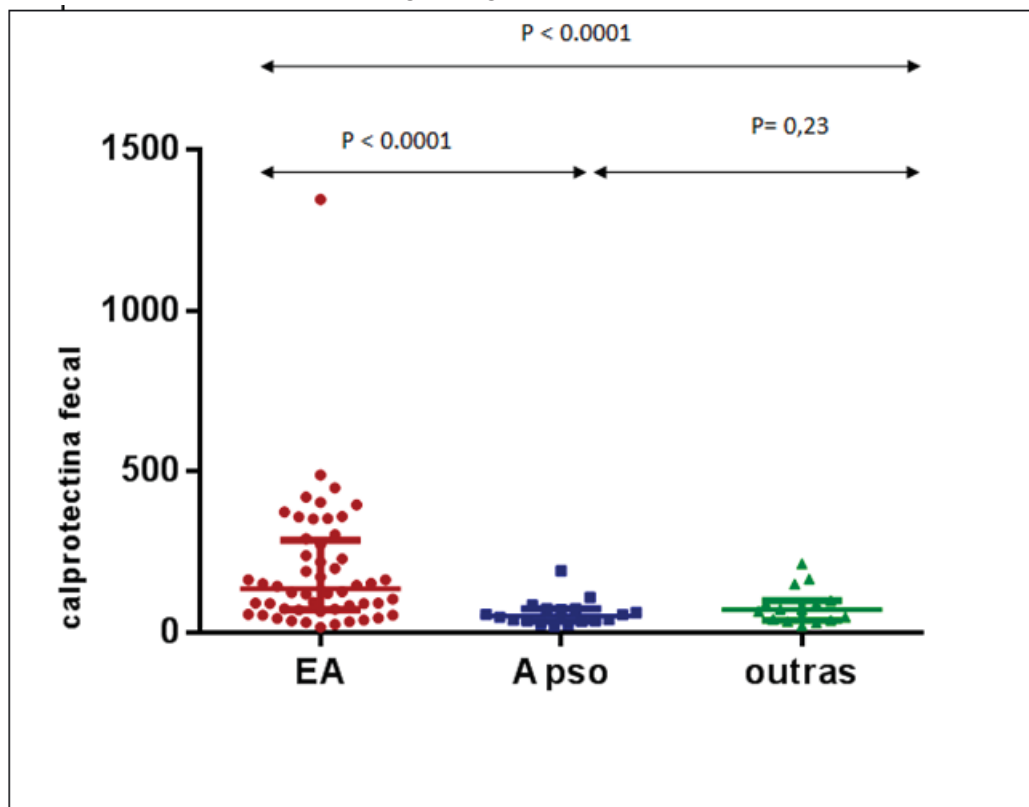
FONTE: a autora

Em 21/85 (29,4%) pacientes existiam queixas gastrintestinais sendo dor abdominal em 5/85 (5,8%); hematoquezia em 8/85(9,4%); alteração de hábito intestinal em 11/85 (12,9 %); diarreia em 8/85 (9,4%); constipação em 8/85 (9,4%).

4.1 ESTUDO DOS VALORES DE CALPROTECTINA FECAL DE ACORDO COM AS VARIÁVEIS CLÍNICAS

O estudo dos valores de calprotectina fecal de acordo com os subtipos de espondiloartrite encontra-se no GRÁFICO 3 que mostra um valor significativamente maior em pacientes com espondilite anquilosante.

GRÁFICO 3 – VALORES DE CALPROTECTINA FECAL DE ACORDO COM O SUBTIPO DE ESPONDILOARTRITE



Fonte: a autora

Nota: Em espondilite anquilosante (EA) = 18,0-1346,0 µg/g (mediana de 137 µg/g);

Em Artrite psoriásica (A.pso) = 21,0-193,0 µg/g (mediana de 53,0 µg/g);

Em outras= 23,0-215,0 µg/g (mediana de 73,0 µg/g) com p<0,0001 (Kruskall Wallis).

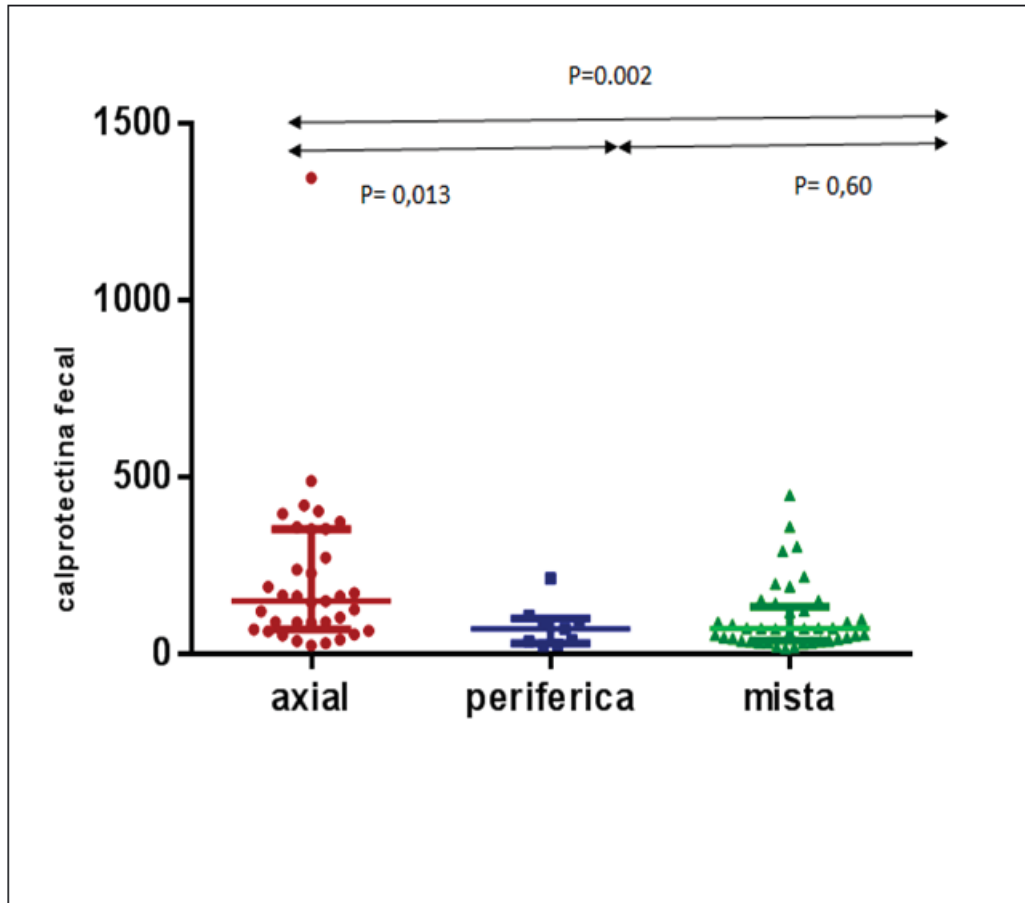
Esp. anquilosante vs A. psoriásica p<0,0001 (Mann Whitney);

A. psoriásica vs outras p=0,23 (Mann Whitney);

Esp. anquilosante vs outras p= 0,006 (Mann Whitney).

Quando os valores de calprotectina fecal foram estudados de acordo com a distribuição do envolvimento musculoesquelético observou-se que a forma axial tem valores de calprotectina fecal mais altos do que as demais, conforme o GRÁFICO 4.

GRÁFICO 4 - CALPROTECTINA FECAL DE ACORDO COM O LOCAL DE ENVOLVIMENTO MUSCULOESQUELÉTICO



Fonte: a autora

Calprotectina na forma axial = 27- 1 346 µg/g (mediana de 152,0 µg/g);

Calprotectina na forma periférica = 25,0-215,0 µg/g (mediana de 73,0 µg/g);

Calprotectina na forma mista = 18 - 450 µg/g (mediana de 74 µg/g); p=0,002(Kruskall Wallis)

Axial vs. periférico p=0.01 (Mann Whitney)

Periférico vs. misto p=0,60 (Mann Whitney)

Axial vs. misto p= 0,001 (Mann Whitney)

A análise dos valores de calprotectina fecal de acordo com as demais variáveis clínicas pode ser observada na TABELA 3. Observa-se que o envolvimento de pele está relacionado negativamente e a uveíte está relacionada positivamente aos valores de calprotectina.

TABELA 3 – ANÁLISE DOS VALORES DE CALPROTECTINA FECAL DE ACORDO COM RAÇA, HLA B27 E MANIFESTAÇÕES EXTRAARTICULARES (MANN WHITNEY)

	Calprotectina (µg/g) em pacientes com a variável	Calprotectina (µg/g) em pacientes sem a variável	p
Caucasianos	18,0-1 346,0 Mediana 92,0 (48,0 - 165,5)	25,0-450,0 Mediana 91,0 (44,2-302,0)	0,
Sexo masculino	21,0-450,0 Mediana 96,0 (55,0-231,0)	18,0-1 346,0 Mediana 74,5(42,7-166,5)	0,26
HLA B27	18,0- 1346,0 Mediana 92,0 (51,0-159,5)	21,0-450,0 Mediana 92,0 (43,7-237,8)	0,57
Lesões de pele	21,0-193,0 Mediana 53,0 (37,5-75,0)	18,0-1346 Mediana 106,0 (58,0-221,0)	0,0004
Uveíte	23,0-490,0 Mediana 121,0 (72,5-354,0)	18,0-1346,0 Mediana de 74,5 (42,7-153,3)	0,04
Fumantes atuais	27-375 Mediana 73,0 (48,0-192,0)	18,0-1 346,0 Mediana 92,5 (49,0-178,0)	0,39

FONTE: a autora, 2018.

Nota: (*) - valores entre parênteses correspondem ao intervalo interquartil

Na TABELA 4 pode ser apreciada a não correlação dos valores de calprotectina fecal com idade, tempo de doença, índice da massa corporal (IMC), índices metrológicos e achados de laboratório.

TABELA 4 – ESTUDO DE CORRELAÇÃO DA CALPROTECTINA FECAL COM DADOS EPIDEMIOLÓGICOS, ÍNDICE DE MASSA CORPORAL, DADOS DE LABORATÓRIO E ÍNDICES METROLÓGICOS

(continua)

Variável	Rho de Spearman	95% IC	P
Idade	0,17	-0,04 a 0,38	0,15
Tempo de doença	0,15	-0,07 a 0,37	0,22
Índice de massa corporal	-0,19	-0,40 a 0,03	0,08
Hemoglobina (g/dL)	-0,03	-0,30 a 0,23	0,70
Leucócitos (mm3)	-0,13	-0,39 a 0,13	0,28
Plaquetas (mm3)	-0,09	-0,35 a 0,17	0,41

TABELA 4 – ESTUDO DE CORRELAÇÃO DA CALPROTECTINA FECAL COM DADOS EPIDEMIOLÓGICOS, ÍNDICE DE MASSA CORPORAL, DADOS DE LABORATÓRIO E ÍNDICES METROLÓGICOS

(conclusão)

Variável	Rho de Spearman	95% IC	P
VHS (mm)	-0,01	-0,23 a 0,20	0,83
PCR (mg/dL)	-0,01	-0,24 a 0,22	0,84
ASDAS VHS	-0,09	-0,33 a 0,16	0,52
ASDAS PCR	-0,07	-0,31 a 0,18	0,57
BASDAI	-0,17	-0,39 a 0,06	0,13
BASMI	0,20	-0,08 a 0,45	0,15
MASES	-0,22	-0,50 a 0,10	0,07
BASFI	0,07	-0,25 a 0,39	0,63
ASQoL	-0,23	-0,54 a 0,13	0,19
HAQ	0,15	-0,18 a 0,45	0,35

FONTE: a autora, 2018.

Nota: VHS=velocidade de hemossedimentação; PCR= Proteína C reativa; ASDAS= Ankylosing Spondylitis disease Activity Score; BASDAI=Bath Ankylosing Spondylitis index; BASMI=Bath Ankylosing Spondylitis metrological index MASES=Maastricht Ankylosing Spondylitis Score; BASFI= Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index; ASQoL= Ankylosing Spondylitis quality of life questionnaire; HAQ=health assessment questionnaire.

Já os valores de calprotectina fecal de acordo com uso de medicamentos encontram-se na TABELA 5.

TABELA 5 – ESTUDO DOS VALORES DE CALPROTECTINA FECAL DE ACORDO COM USO DE MEDICAMENTOS

(continua)

	Calprotectina (µg/g) com uso do medicamento	Calprotectina (µg/g) sem uso do medicamento	P
USO DE AINHS			
AINH qualquer uso	25,0-1346,0 Mediana de 84,0 (46,0-234,3)	18,0-422,0 Mediana de 92,0 (48,0-159,5)	0,69
AINH contínuo (*)	25,0-1346 Mediana de 96,0 (43,0-221,0)	18,0-422,0 Mediana de 92,0 (48,0-159,5)	0,67
AINH demanda (**)	49,0- 362,0 Mediana de 76,0 (61,5-227,0)	18,0-422,0 Mediana de 92,0 (61,5-227,0)	0,95

TABELA 5 – ESTUDO DOS VALORES DE CALPROTECTINA FECAL DE ACORDO COM USO DE MEDICAMENTOS

	(conclusão)		
	Calprotectina (µg/g) com uso do medicamento	Calprotectina (µg/g) sem uso do medicamento	P
USO DE DMARDs			
Qualquer	21,0-405,0 Mediana de 87,0 (49,0-192,0)	18,0-1346,0 Mediana de 92,5 (46,5-180,0)	0,67
Metotrexato	21,0-305,0 Mediana 75,0 (38-215,0)	18,0-1346,0 Mediana de 123,0 (62,5-220,5)	0,29
Sulfassalazina	55,0-405,0 Mediana de 135,5 (94,2-186,0)	18,0-1346,0 Mediana de 85,0 (44,0-183,5)	0,16
Leflunomida	25,0-193,0 Mediana de 74,5 (43,0-113,5)	18,0-1346,0 Mediana de 92,0 (47,0-192,0)	0,38
USO DE ANTI TNF-α			
Qualquer Anti TNF	23,0- 1346 Mediana de 92,5 (49,0-194,3)	18,0-490,0 Mediana de 92,0 (49,0-193,0)	0,88
Etanercept	23,0-398,0 Mediana de 126,0 (55,0-174,0)	18,0-490,0 Mediana de 91,0 (49,0-192,0)	0,57
Anticorpo monoclonal	28,0-1346,0 Mediana de 69,0 (41,2-207,3)	18,0-490,0 Mediana de 91,0 (49,0-192,0)	0,53
Infliximabe	58,0-293,0 Mediana de 166,0 (79,5-257,0)	18,0-490,0 Mediana de 91,0 (49,0-192,0)	0,30
Adalimumabe	28,0-450,0 Mediana de 52,0 (38,5-91,0)	18,0-490,0 Mediana de 91,0 (49,0-192,3)	0,10
Outros anti TNF	N muito pequeno		
Bloqueador de bomba de próton	27,0-1346,0 Mediana de 88,5 (56,5-178,5)	18,0- 422,0 Mediana de 93,0 (42,0-193,0)	0,65

FONTE: a autora, 2018.

Nota: (*) estudo pacientes em uso contínuo vs não usuários; (**) estudo de pacientes de uso por demanda vs não usuários

Todos os anti TNF α individuais foram testados contra os não usuários de anti TNFα; todos os DMARDs individuais foram testados contra os não usuários de DMARD.

Valores entre parênteses = intervalo interquartil; AINH= anti-inflamatório não hormonal; DMARD= droga modificadora de doença.

A análise de calprotectina fecal de acordo com a presença ou não de queixas gastrointestinais, encontra-se na TABELA 6. Nenhuma das queixas estudadas se associou elevação de calprotectina.

TABELA 6 – NÍVEIS DE CALPROTECTINA FECAL DE ACORDO COM PRESENÇA OU NÃO DE QUEIXAS GASTROINTESTINAIS

	Calprotectina (µg/g) em pacientes com queixas	Calprotectina (µg/g) em pacientes sem queixas	P
Qualquer queixa	36,0-1346	18,0-490,0	0,37
	Mediana de 87,0 (52,0-287,5)	Mediana de 92,0 (43,2-167,5)	
Dor abdominal	39,0-422,0	18,0-1346,0	0,96
	Mediana 58,0 (44,0-281,0)	Mediana de 92,0 (43,2-167,5)	
Alteração de hábito intestinal	39,0-1346,0	16,0-490,0	0,70
	Mediana de 87,0 (45,0-221,0)	Mediana de 92,0 (43,2-167,5)	
Diarreia	39,0-1346,0	18,0-490	0,89
	Mediana de 61,5 (43,5-320,8)	Mediana de 92,0 (43,2-167,5)	
Constipação	36,0-405,0	18,0-1346,0	0,90
	Mediana de 89,0 (44,5-302,8)	Mediana de 92,0 (43,2-167,5)	
Hematoquezia	36,0-422,0	18,0-1346,0	0,62
	Mediana de 101,5 (55,0-207,0)	Mediana de 92,0 (43,2-167,5)	

FONTE: a autora, 2018.

Nota: Todas as queixas individuais foram testadas contra pacientes sem queixas.

Como a análise univariada demonstrou que os níveis séricos de calprotectina estão associados com o tipo de espondilite, a forma de envolvimento musculoesquelético (axial vs. periférica) e as manifestações e pele e de olho, foi realizada uma regressão múltipla para testar a independência das variáveis e apenas a forma de envolvimento musculo esquelético ($p=0,04$) e o diagnóstico da espondilite anquilosante ($p=0,03$) permaneceram significativos.

4.2 ESTUDO DOS ACHADOS ILEOCOLONOSCÓPICOS E SUAS ASSOCIAÇÕES COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E CALPROTECTINA FECAL

Dos 85 pacientes participantes 39 concordaram com a realização de ileocolonoscopia (15 mulheres e 24 homens). Destes, 15 estavam em uso de anti-TNF α (6 com adalimumabe, 4 com infliximabe, 4 com etanercept, 1 certolizumabe); 5 em uso de sulfassalazina, 6 de metotrexate e 2 de leflunomida. Os diagnósticos de espondiloartrite neste grupo eram de espondilite anquilosante em 23/39 (58.9%); artrite psoriásica em 7/39(17.9%), espondilite juvenil em 3/39 (7.6%); espondilite não

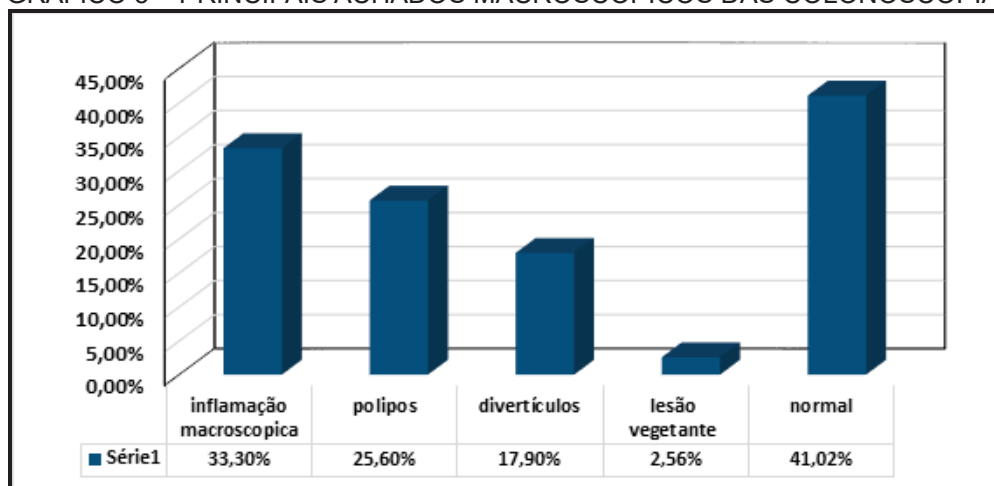
radiográfica em 3/39 (7.6%); espondilite indiferenciada em 2/39 (5.1%) e artrite reativa em 1/39 (2.5%).

Destes 39 pacientes, 25 tiveram uma segunda dosagem de calprotectina simultânea com a colonoscopia. Neste subgrupo existiam 3/25 (12%) tinham calprotectina acima de 200 µg/g; 12/25 (48%) tinham valores entre 50 e 199 µg/g e 10/25 (40%) tinham calprotectina < 50 µg/g. Em 60% (15/25) a calprotectina fecal estava ≥ 50 µg/g. Nesta ocasião todos os pacientes tinham tido os seus AINHS suspensos por, pelo menos 21 dias (3 semanas). Separando-se o subgrupo de usuários de AINHS que fizeram a segunda dosagem de calprotectina observou-se que, com o uso destes medicamentos, seu valor era de 36-490 µg/g (mediana de 215 µg/g, IIQ de 67-405 µg/g). Após a suspensão dos AINHS os valores eram de 36-165 µg/g (mediana de 76,0 µg/g; IIQ de 42,7 a 116,3 µg/g) com p=0.01.

Novo estudo da calprotectina sérica (agora sem interferência dos AINHS) com parâmetros inflamatórios e funcionais como hemoglobina, VHS, PCR, ASDAS VHS, ASDAS PCR, BASDAI, BASFI, BASMI, MASES, ASQoL, HAQ não demonstrou existir correlação entre estas variáveis (todos com p=ns).

Os principais achados das colonoscopias encontram-se resumido no GRÁFICO 5, onde pode ser visto que existia inflamação macroscopicamente detectável em quase 1/3 dos pacientes.

GRÁFICO 5 – PRINCIPAIS ACHADOS MACROSCÓPICOS DAS COLONOSCOPIAS (N=39)



FONTE: a autora

A associação entre achados macroscópicos e níveis de calprotectina fecal realizados simultaneamente com a ileocolonoscopia encontram-se na TABELA 7.

Nesta tabela destaca-se a associação positiva dos níveis de calprotectina fecal com os achados de inflamação macroscopicamente visível.

TABELA 7 – ESTUDO DOS NÍVEIS DE CALPROTECTINA FECAL DE ACORDO COM ACHADOS ILEOCOLONOSCÓPICOS (N=25) (*)

	Calprotectina (µg/g) com achado endoscópico	Calprotectina (µg/g) sem achado endoscópico	p
Pólipos	36,0-138,0 Mediana de 51,0 (36,0-100,5)	41,0-281,0 Mediana de 138,0 (43,0-274,0)	0,055
Divertículos	36,0-281,0 Mediana de 90,5 (39,7-188,0)	36,0-274,0 Mediana de 104,5 (44,0-223,5)	0,99
Processo inflamatório	65,0-281,0 Mediana de 138,0 (88,0-274,0)	36,0-138,0 Mediana de 39,0 (36,0-66,7)	0,009

FONTE: a autora, 2018.

Nota: (*) o nível de calprotectina utilizado aqui foi o dosado simultaneamente com a colonoscopia.

Na ileocolonosopia, uma das pacientes caracterizou-se como tendo doença inflamatória intestinal e foi excluída da análise histológica do trabalho. Esta paciente encontrava-se usando certolizumabe no momento do aparecimento da DII.

Apenas 27 pacientes apresentaram amostra suficiente para análise conforme protocolo estabelecido. A análise descritiva dos achados microscópicos mostrou os dados das TABELAS 8, 9 e 10. Nestas tabelas é possível verificar que nenhum paciente apresentou granulomas epitelióides ou espessamento de membrana basal; que a ocorrência de erosões foi rara (3 em íleo e 3 em reto) e que o aparecimento de infiltrado linfoplasmocitário foi quase universal e com predomínio em toda a espessura da mucosa ou porção luminal.

TABELA 8 – ANÁLISE DESCRITIVA DOS ACHADOS MICROSCÓPICOS DE BIÓPSIA INTESTINAL RELEVANTES PARA O ESTUDO OBTIDOS POR COLONOSCOPIA (N=27) EM ÍLEO E COLON ASCENDENTE

ILEO	
Mucosa ileal preservada	2/27
Ileíte crônica linfoplasmocitária	Ausente- 2/27 Presente - 25/27 Discreta- 19/27 Moderada- 6/27 Intensa - 0
Infiltrado eosinofílico	Ausente 4/27 Presente 23/27 Pequena quantidade - 17/27 Média quantidade – 6/27 Grande quantidade -0
Erosão epitelial	Ausente - 24/27 Presente - 3/27
Hiperplasia linfoide	Ausente – 12/27 Presente- 15/27
Granuloma epitelióide	Ausente- 27/27 Presente- 0

FONTE: a autora, 2018.

TABELA 9 – ANÁLISE DESCRITIVA DOS ACHADOS MICROSCÓPICOS DE BIÓPSIA INTESTINAL RELEVANTES PARA O ESTUDO OBTIDOS POR COLONOSCOPIA (N=27) EM CÓLON ASCENDENTE E TRANSVERSO

(continua)

COLON ASCENDENTE	
Mucosa ileal preservada	0
Infiltrado crônico linfoplasmocitário	Ausente -0 Discreta – 8/27 Moderada – 19/27 Intensa - 0
Infiltrado eosinofílico	Ausente- 4/27 Pequena quantidade - 17/27 Média quantidade – 6/27 Grande quantidade-0
Distribuição das células inflamatórias	Em toda espessura-11/27 Predomínio luminal – 16/27

TABELA 9 – ANÁLISE DESCRITIVA DOS ACHADOS MICROSCÓPICOS DE BIOPSIA INTESTINAL RELEVANTES PARA O ESTUDO OBTIDOS POR COLONOSCOPIA (N=27) EM CÓLON ASCENDENTE E TRANSVERSO

(conclusão)

	Predomínio basal – 0
Espessamento da membrana basal	Ausente – 27/27 Presente -0
Erosão epitelial	Ausente – 27/27 Presente - 0
Hiperplasia linfoide	Ausente- 21/27 Presente- 6/27
Granuloma epitelióide	Ausente- 27/27 Presente -0
CÓLON TRANSVERSO	
Mucosa preservada	3/27
Infiltrado crônico linfoplasmocitário	Ausente – 3/27 Discreto – 10/27 Moderado – 14/27 Intenso - 0
Infiltrado eosinofílico	Ausente- 5/27 Pequena quantidade – 15/27 Média intensidade- 7/27 Grande quantidade – 0
Distribuição das células inflamatórias	Em toda espessura- 12/27 Predomínio luminal- 12/27 Predomínio basal -0
Erosão epitelial	Ausente – 27/27 Presente - 0
Espessamento de membrana basal	Ausente – 27/27 Presente -0
Hiperplasia linfoide	Ausente – 19/27 Presente – 8/27
Granuloma epitelióide	Ausente- 27/27 Presente 0

FONTE: a autora, 2018

TABELA 10 – ANÁLISE DESCRITIVA DOS ACHADOS MICROSCÓPICOS DE BIOPSIA INTESTINAL RELEVANTES PARA O ESTUDO OBTIDOS POR ILEOCOLONOSCOPIA (N=27) EM CÓLON DESCENDENTE E RETO

(continua)

Mucosa preservada	0
Infiltrado crônico linfoplasmocitário	Ausente -0

TABELA 5 – ANÁLISE DESCRITIVA DOS ACHADOS MICROSCÓPICOS DE BIOPSIA INTESTINAL RELEVANTES PARA O ESTUDO OBTIDOS POR ILEOCOLONOSCOPIA (N=27) EM CÓLON DESCENDENTE E RETO

		(conclusão)
		Discreto – 14/27 Moderado – 13/27 Intenso -0
Infiltrado eosinofílico	Ausente – 2/27	
		Pequena intensidade - 18/27 Média intensidade - 7/27 Grande intensidade - 0
Distribuição das células inflamatórias	Em toda espessura- 15/27 Predomínio luminal – 11/27 Predomínio basal- 0	
Erosão epitelial	Ausente- 27/27 Presente - 0	
Espessamento de membrana basal	Ausente-27/27 Presente- 0	
Hiperplasia linfoide	Ausente- 16/27 Presente- 11/27	
Granuloma epitelióides	Ausente- 27/27 Presente – 0	
RETO		
Mucosa preservada	0	
Infiltrado crônico linfoplasmocitário	Ausente - 0	
		Pequena intensidade – 21/27 Média intensidade – 7/27 Grande intensidade -0
Infiltrado eosinofílico	Ausente - 0	
		Pequena intensidade – 7/27 Média intensidade - 20/27 Grande intensidade - 0
Distribuição das células inflamatórias	Em toda espessura – 23/27 Predomínio luminal- 4/27 Predomínio basal- 0	
Erosão epitelial	Ausente -24/27 Presente -3/27	
Espessamento de membrana basal	Ausente -27/27 Presente-0	
Hiperplasia linfoide	Ausente- 19/27 Presente- 8/27	
Granulomas epitelióide	Ausente -27/27 Presente -0	

FONTE: a autora, 2018.

Estudando-se o intestino como um todo observaram-se a presença dos achados histológicos descritos na TABELA 11.

TABELA 6 – PRESENÇA DE ACHADOS HISTOLÓGICOS EM QUALQUER DOS SEGMENTOS INTESTINAIS ESTUDADOS

Achado histológico	N - %
Histologia normal	0
Erosões	6/27 - 22.2% - 3 pacientes em uso de etanercept.
Infiltrado linfoplasmocitário	27/27 - 100%
Infiltrado eosinofílico	27/27 - 100%
Hiperplasia linfoide	25/27 - 92,5%

FONTE: a autora, 2018.

Estudando-se os níveis de calprotectina fecal observou-se que pacientes com erosões tinham valores entre 39,0 e 138,0 $\mu\text{g/g}$ (mediana de 102 com IIQ de 49,0-129,5 $\mu\text{g/g}$) e os sem erosões tinham valores de 36,0 a 281,0 $\mu\text{g/g}$ (mediana de 50,5; IIQ=37,7 a 142,8 $\mu\text{g/g}$) com $p= 0,51$. Destes 6 pacientes com erosões só dois tinham sintomas gastrintestinais e ambos apresentavam diarreia com sangue.

Devido à presença quase universal dos demais achados não foi possível estudar as diferenças de calprotectina fecal quanto à presença de infiltrado linfoplasmocitário, infiltrado eosinofílico nem hiperplasia linfoide.

Agrupando-se os achados ileocolonoscópicos por localização observam-se os dados da TABELA 12 da próxima página.

TABELA 7 – PRINCIPAIS ACHADOS HISTOLÓGICOS SEGUNDO A LOCALIZAÇÃO INTESTINAL

(continua)

Mucosa preservada	Íleo-2/27 Cólon direito -0 Cólon transverso-3/27 Cólon esquerdo -0 Reto -0
Infiltrado crônico linfoplasmocitário	Íleo- 25/27 Cólon direito-27/27 Cólon transverso-24/27 Cólon esquerdo -27/27 Reto -27/27

TABELA 82 – PRINCIPAIS ACHADOS HISTOLÓGICOS SEGUNDO A LOCALIZAÇÃO INTESTINAL
(conclusão)

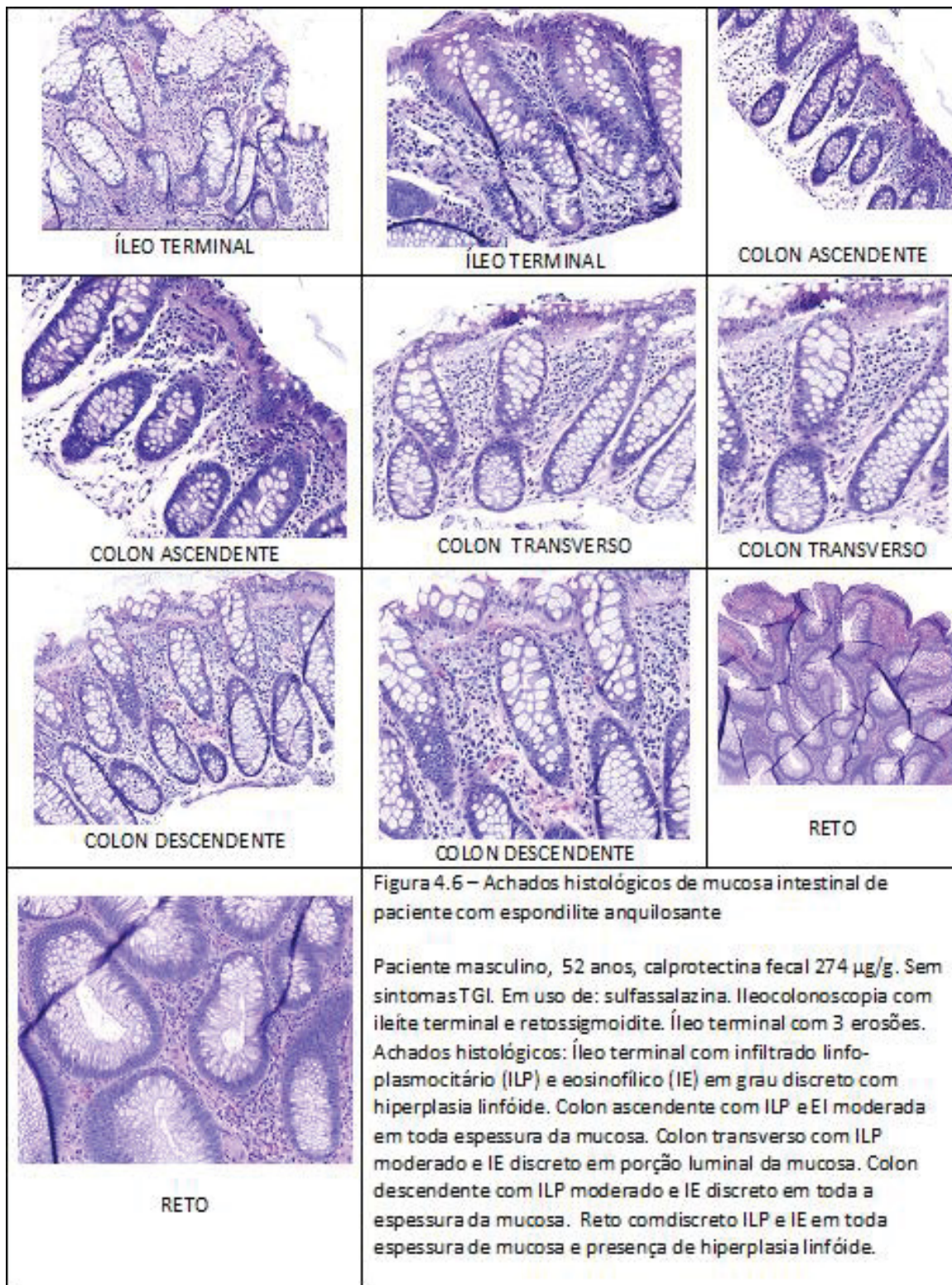
Infiltrado eosinofílico	Íleo-23/27 Cólon direito- 23/27 Cólon transverso-22/27 Cólon esquerdo -25/27 Reto-27/27
Erosão epitelial	Íleo -3/27 Cólon direito- 0 Cólon transverso -0 Cólon esquerdo- 0 Reto -3/27
Hiperplasia linfoide	Íleo -15/27 Cólon direito- 6/27 Cólon transverso-8/27 Cólon esquerdo -11/27 Reto -8/27

OBS- Nenhum segmento mostrou – granulomas epitelióides nem espessamento de membrana basal

FONTE: a autora, 2018.

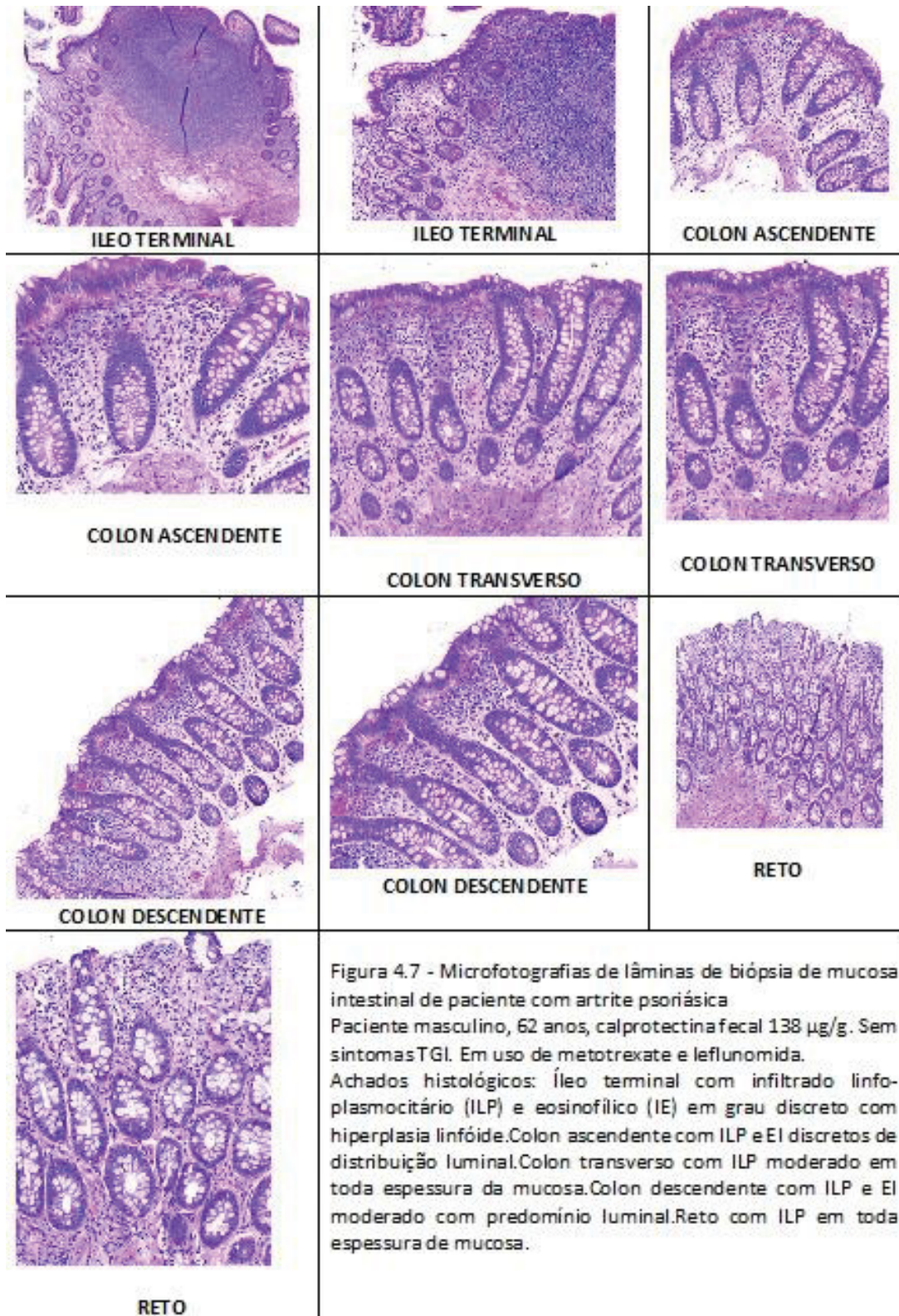
A seguir algumas ilustrações dos achados histológicos de três dos pacientes estudados, conforme as FIGURAS 5, 6 e 7.

FIGURA 5 – ACHADOS HISTOLÓGICOS DE BIÓPSIA INTESTINAL DE MUCOSA INTESTINAL DE PACIENTE COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE



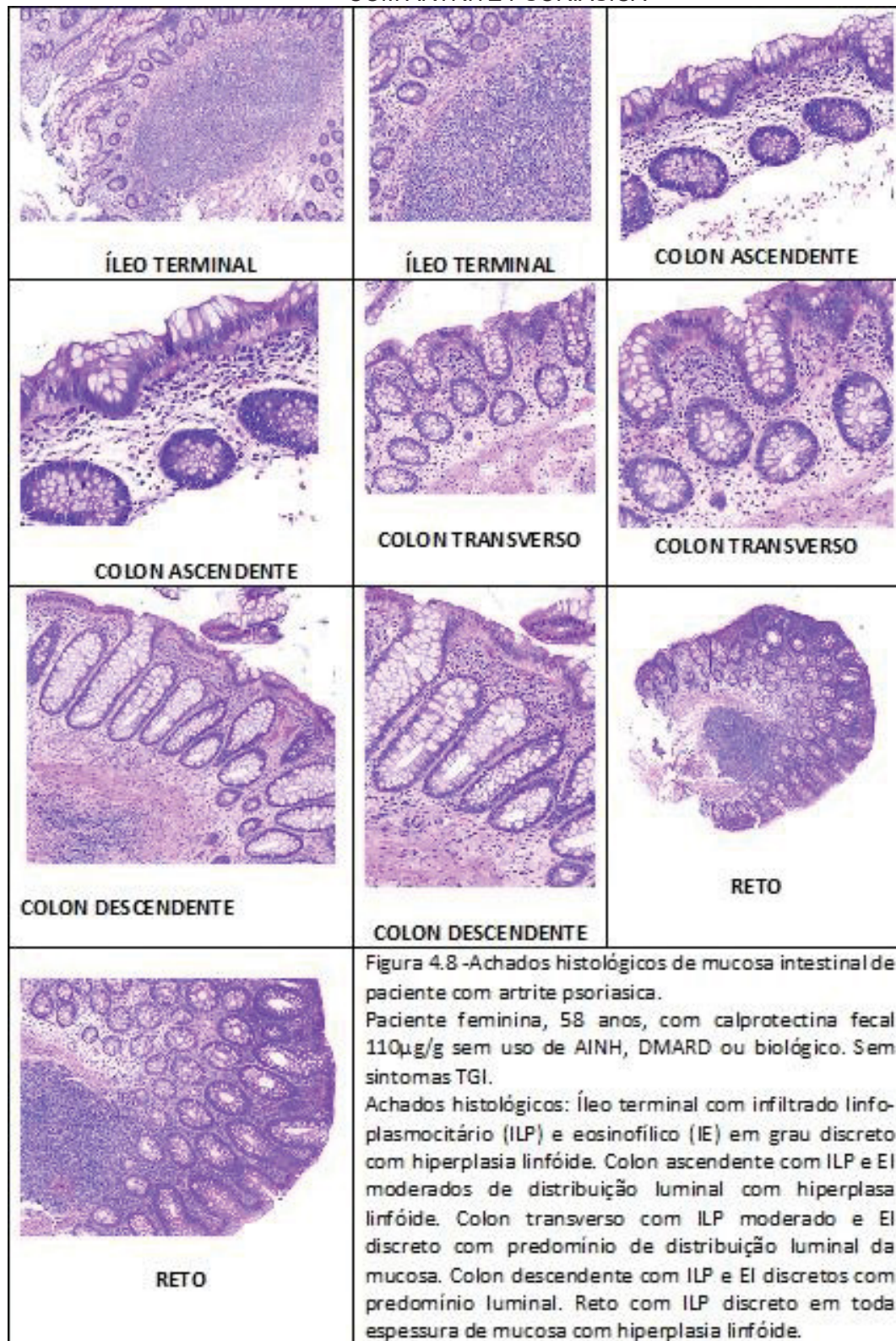
FONTE: a autora, 2018.

FIGURA 6 – MICROFOTOGRAFIAS DE BIÓPSIAS DE INTESTINO DE PACIENTE COM ARTRITE PSORIÁSICA



FONTE: a autora, 2018.

FIGURA 7 – ACHADOS HISTOLÓGICOS DE BIÓPSIA DE MUCOSA INTESTINAL DE PACIENTE COM ARTRITE PSORIÁSICA



FONTE: a autora, 2018.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo é pioneiro na investigação da inflamação intestinal em pacientes brasileiros com EpA através do uso de calprotectina fecal. Nossos achados confirmam a alta prevalência de inflamação intestinal subclínica em pacientes com EpA e a necessidade do uso de um biomarcador não invasivo para triagem dessa inflamação na mucosa intestinal desses pacientes. Além disso, verificou-se que os pacientes com maior inflamação intestinal apresentam a forma radiográfica, que se traduz em maior lesão estrutural.

A composição étnica presente na amostra reflete a alta miscigenação da população brasileira, com 23,5% de afrodescendentes. Tal achado difere da literatura dado que EpA pode ser considerada uma doença que pode ocorrer de forma mais frequente em caucasianos.

Em relação ao perfil clínico, a maioria dos pacientes apresentavam-se sem sinais de atividade de doença medidos pelos índices clínicos aplicados. Em relação à medicação em uso, muitos dos medicamentos que são utilizados no tratamento da EpA, também o são para doença inflamatória intestinal, o que pode influenciar no resultado da calprotectina fecal, que mede tal inflamação. No entanto, as doses utilizadas para tratamento de doença de Crohn ou retocolite ulcerativa em geral são distintos das utilizadas pelos pacientes com EpA. Embora 44,7% dos pacientes estivessem em uso de biológicos (anti alfa TNF) por tempo mediano de 20 meses, mais de 70% da amostra apresentou valores aumentados de calprotectina fecal, considerando-se o valor de referência de 50 µg/g, sendo a maioria desses assintomáticos para trato gastrointestinal. Os pesquisadores definiram que seriam convidados para realização da ileocolonoscopia aqueles com valores maiores que 200 µg/g, pacientes sintomáticos em relação ao trato gastrointestinal e pacientes com indicação de rastreio de câncer colorretal. Tal decisão se deve ao fato de o exame ser invasivo e de alto custo. Observou-se primeiramente que pacientes com doença predominantemente axial tinham valores significativamente aumentados de calprotectina fecal, principalmente pacientes com a forma radiográfica também considerados como EA. A maior parte dos estudos que avaliaram calprotectina fecal nas espondiloartrites avaliou apenas o subgrupo EA, diferentemente do nosso estudo que incluiu todo o espectro da doença. Cypers et al. (2016) observou em seu

estudo que pacientes com a forma periférica apresentavam uma tendência a valores mais elevados de CF, porém pelo fato de sua amostra de pacientes com EpA periférica ser pequena, este dado não pôde ser extrapolado. A análise dos valores de calprotectina fecal de acordo com as variáveis clínicas demonstrou que o envolvimento de pele está relacionado negativamente. Por outro lado, a uveíte está relacionada positivamente aos valores de CF. Tal dado não foi relatado previamente na literatura, sendo inédito.

Nossos dados não mostraram correlação dos valores de calprotectina fecal com idade, tempo de doença, índice da massa corporal (IMC), índices metrológicos e achados de laboratório. Chama a atenção a falta de correlação com marcadores inflamatórios sanguíneos como PCR e VHS. Além disso os índices clínicos de atividade e função (BASDAI, ASDAS, BASFI) avaliam preponderantemente dados como dor, fadiga, comprometimento articular, não levando em consideração nenhuma queixa relacionada ao trato digestório ou demais sistemas, sendo também de origem subjetiva. É controverso na literatura a correlação entre marcadores inflamatórios sanguíneos, índices clínicos e dosagem de calprotectina fecal, porém a maior parte dos estudos apontam haver correlação. (KLINGBERG et al., 2012; CYPERS et al., 2016; KLINGBERG, 2017; MARTINS et al., 2017). Este achado em nosso estudo pode se dever ao fato de serem pacientes com maior tempo de doença, pacientes em grande parte em uso de medicação imunobiológica e pacientes clinicamente controlados.

Em relação a influência que o uso de determinadas medicações pode ter nos níveis de CF, observamos que houve uma discreta diminuição nos valores de CF após ter sido orientado a suspensão de AINHS 3 semanas antes da segunda dosagem no momento da ileocolonosopia. Tais dados são semelhantes com os achados da literatura (KLINGBERG et al., 2017).

De forma interessante, os pacientes que apresentavam as concentrações de calprotectina fecal maiores que 200 µg/g não tinham queixas gastrintestinais, assim como não havia diferença significativa nas concentrações de calprotectina fecal entre os pacientes com e sem queixas gastrointestinais. Podemos inferir que a inflamação presente na mucosa intestinal dos pacientes não se repercutia em sintomas clínicos, podendo estar sendo mascarado pelo uso dos

imunossupressores. Por outro lado, reforça a importância de um biomarcador sensível para a detecção da inflamação intestinal.

Dentre os pacientes encaminhados para ileocoloscopia, 60% apresentaram alterações, sendo a mais frequente inflamação macroscópica. Como esperado, pacientes com esse achado tinham concentrações de calprotectina fecal significativamente aumentadas, conferindo uma boa correlação entre os métodos como também foi demonstrado por Cypers et al. (2016).

Na análise histológica, a totalidade dos pacientes que fizeram tal procedimento apresentavam infiltrado celular, seja linfoplasmocitário ou eosinofílico. Tal dado informa o estado de inflamação da mucosa, porém nenhum dos casos foi observado a presença de alterações estruturais típicas para diagnóstico de doença inflamatória intestinal.

Limitações do estudo são inerentes ao desenho transversal e ao fato de não ser possível em um único centro, conseguir o tamanho amostral muito maior do que o obtido. A força do estudo está relacionada a alta sensibilidade da calprotectina fecal na detecção da inflamação intestinal e à experiência do grupo de pesquisadores na área de gastroenterologia e reumatologia, tanto nos aspectos clínicos e laboratoriais.

6 CONCLUSÕES

A calprotectina fecal mostrou-se mais alta nos pacientes com erosões vistas à ileocolonoscopia refletindo achados de inflamação macroscópica. Todavia não foi possível provar o seu valor na detecção de inflamação microscópica porque este foi um achado universal nos pacientes avaliados.

Não foi possível demonstrar que a calprotectina fecal está associada com atividade de doença vista pelo BASDAI, ASDAS VHS, ASDAS PCR, VHS e PCR.

A calprotectina fecal é mais alta nos pacientes com espondiloartrite classificados como espondilite anquilosante e nos pacientes que apresentam a forma axial da doença. O uso de drogas modificadoras de doença e o uso de imunobiológicos não alteraram os valores da calprotectina fecal. Quanto ao AINHS, embora não fosse possível demonstrar diferenças entre os usuários e não usuários desta classe de medicamento, observou-se que os valores de calprotectina fecal diminuiriam significativamente quando este medicamento foi suspenso.

Considerando achados histopatológicos de inflamação, não foi possível estudar as variações da calprotectina fecal quanto à sua presença ou ausência pois todos os pacientes submetidos a esta análise apresentaram inflamação intestinal microscópica.

REFERÊNCIAS

AKKOC, A. Are spondyloarthropathies as common as rheumatoid arthritis worldwide? **Curr. rheumatol. rep.**, v. 10, p. 371-378, 2008.

BAETEN, D. Are Spondyloarthritis related but distinct conditions or a single disease with a heterogeneous phenotype? **Arthritis rheum.**, v. 65, n. 1, p. 12-20, 2013.

BJARNASON, I. The use of fecal calprotectin in inflammatory bowel disease. **Gastroenterol. hepatol.**, v. 13, p. 53-56, 2017.

BURRY, E. et al. The use of fecal calprotectin as a biomarker in gastrointestinal disease. **Expert rev. gastroenterol. hepatol.**, v. 8, n. 2, p. 197-210, 2014.

CAMPOS, J. **Exame Calprotectina fecal para o diagnóstico de doença de Crohn e Colite Ulcerativa**. 2013. Disponível em: <<http://www.crohnecolite.com.br/2013/11/calprotectina-fecal.html>>. Acesso em: 25 nov. 2015.

COLONOSCOPIES. [201-]. Disponível em: <<http://missbelmonte.weebly.com/colonoscopies.html>>. Acesso em: 25 nov. 2015.

CURVELIER, C. et al. Histopathology of intestinal inflammation related to reactive arthritis. **Gut.**, v. 28, n. 4, p. 394-401, 1987.

CUSMANICH, K. G. **Validação para a língua portuguesa dos instrumentos de avaliação de índice funcional e índice de atividade de doença em pacientes com espondilite anquilosante**. 2006. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

CYPERS, H. et al. Elevated calprotectin reveal bowel inflammation in spondyloarthritis. **Ann Rheum Dis.**, v. 75, p. 1357-1362, 2016.

DE VOS, M. et al. Long-term evolution of gut inflammation in patients with spondyloarthropathies. **Gastroenterology.**, v. 110, p. 1696-1703, 1996.

DOUGADOS, M.; BAETEN, D. Spondyloarthritis. **Lancet.**, v. 377, p. 2127-2137, 2011.

ELEWAUT, D.; MATUCCI-CERINIC, M. Treatment of ankylosing spondylitis and extra-articular manifestations in everyday rheumatology practice. **Rheumatology (Oxford).**, v. 48, p. 1029-1035, 2009.

FABREGUE, I. et al. Assessment of work instability in spondyloarthritis: a cross-sectional study using the ankylosing spondylitis work instability scale. **Rheumatology.**, v. 51, p. 333-337, 2012.

FERRAZ, M. B. et al. Cross cultural reliability of the physical ability dimension of the Health Assessment Questionnaire. **J. rheumatol.**, v. 17, p. 813-817, 1990.

GARCÍA-KUTZBACH A, A. et al. Reactive arthritis: update 2018. **Clin. rheumatol.**, fev. 2018. doi: 10.1007/s10067-018-4022-5.

GREENSTEIN, A. J.; JANOWITZ, H. D.; SACHAR, D. B. The extraintestinal complications of Crohn's disease and ulcerative colitis: a study of 700 patients. **Medicine (Baltimore)**., v. 55, p. 401-411, 1976.

HANAUER, S. B. **Doenças inflamatórias intestinais**. 2013. Disponível em: <http://www.medicinanet.com.br/conteudos/acp-medicine/5262/doencas_inflamatorias_intestinais_%E2%80%93_stephen_b_hanaue_r.htm>. Acesso em: 25 nov. 2015.

HEUFT-DORENBOSCH, L. et al. Assessment of enthesitis in ankylosing spondylitis. **Ann. Rheum. dis.**, v. 62, p. 127-132, 2003.

HOMMES, D. W.; VAN DEVENTER, S. J. Endoscopy in inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**., v. 126, p. 1561-1573, 2004.

HSU, K. et al. Anti-infective protective properties of S100 calgranulins. *Antiinflamm Antiallergy*. **Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem.**, v. 8, p. 290-305, 2009.

JACQUES, P.; ELEWAUT, D. Joint expedition: linking gut inflammation to arthritis. **Mucosal Immunol.**, v. 1, p. 364-371, 2008.

KLINGBERG, E. et al. A longitudinal study of fecal calprotectin and the development of inflammatory bowel disease in ankylosing spondylitis. **Arthritis Res Ther.**, v. 19, p. 19-21, 2017.

KLINGBERG, E. et al. Calprotectin in ankylosing spondylitis – frequently elevated in feces but normal in serum. **Scand. j. gastroenterol.**, v. 47, p. 435-444, 2012.

KONIKOFF, M. R; DENSON, L. A. Role of fecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in inflammatory bowel disease. **Inflamm Bowel Dis.**, v. 12, p. 524-534, 2012.

KOTZE, L. M. A. et al. Fecal calprotectin: levels for the ethiological diagnosis in Brazilian patients with gastrointestinal symptoms. **Arq. Gastroenterol.**, São Paulo, v. 52, n. 1, p. 50-54, 2015.

LIN, J. F. et al. Meta-analysis: fecal calprotectin for assessment of inflammatory bowel disease activity. **Inflamm Bowel Dis.**, v. 20, p. 1407-1415, 2014.

MAK, W. Y. et al. Fecal Calprotectin in Assessing Endoscopic and Histological Remission in Patients with Ulcerative Colitis. **Dig Dis Sci.**, fev. 2018. doi: 10.1007/s10620-018-4980-0.

MARTINDALE, J. et al. The impact of ankylosing spondylitis/axial spondyloarthritis on work productivity. **Best Pract Res Clin Rheumatol.**, v. 28, p. 512-523, 2015.

MARTINS, D. et al. Fecal calprotectin's role as marker of inflammatory bowel disease in an ankylosing spondylitis population. **Rev Portuguesa Coloproctol.**, p. 6-11, maio/out. 2017.

MATZKIES, F. et al. Markers of intestinal inflammation in patients with ankylosing spondylitis: a pilot study. **Arthritis Res Ther.**, v. 14, R261, 2012.

MENDALL, M. A. et al. Fecal calprotectin: factors affecting levels and its potential role as a surrogate marker for risk of development of Crohn's disease. **BMC Gastroenterol.**, v. 7, p. 16-126, 2016.

MICHELTSEN, B. et al. A comparison of disease burden in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and axial spondyloarthritis. **PLoS ONE.**, v. 10, e0123582, 2015.

MIELANTS, H. et al. Gut inflammation in the spondyloarthropathies: clinical, radiologic, biologic, and genetic features in relation to the type of histology. A prospective study. **J. rheumatol.**, v. 18, p. 1542-1551, 1991.

MIELANTS, H. et al. The evolution of spondyloarthropathies in relation to gut histology. II. Histological aspects. **J Rheumatol.** 1995 Dec;22(12):2273-8.

MIELANTS, H. et al. The evolution of spondyloarthropathies in relation to gut histology. III. Relation between gut and joint. **J Rheumatol.** 1995 Dec;22(12):2279-84.

MOLL, J. et al. Associations between ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, Reiter's disease, the intestinal arthropathies, and Behçet's syndrome. **Medicine**, v. 53, p. 343-364, 1974.

REVEILLE, J. Prevalence of axial spondyloarthritis in the United States: Estimates from a cross-sectional survey. **Arthritis Care Res.**, v. 64, n. 6, p. 905-910, 2012.

RUDWALEIT, M. et al. The Assessment of SpondyloArthritis International Society classification criteria for peripheral spondyloarthritis and for spondyloarthritis in general. **Ann Rheum Dis.**, v. 70, p. 25-31, 2011.

RUDWALEIT M. et al. The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II): validation and final selection. **Ann Rheum Dis.** 2009 Jun;68(6):777-83. doi: 10.1136/ard.2009.108233. Epub 2009 Mar 17.

SCHETT, G. et al. Enthesitis: from pathophysiology to treatment. **Nat Rev Rheumatol.**, v. 13, p. 731-741, 2017.

SCHIOTIS, R. E. et al. Panorama de la clasificación y la susceptibilidad genética de las espondiloartritis. **Reumatol. clín.**, v. 4, supl. 4, p. S8-16, 2008.

SHINJO, S. K. et al. Brazilian-portuguese version and applicability questionnaire of the mobility index for ankylosing spondylitis. **Clinics**, v. 62, p. 139-144, 2007.

SIEPER, J. et al. Concepts and epidemiology of spondyloarthritis. **Best Pract Res Clin Rheumatol.**, v. 20, p. 401-417, 2006.

SIEPER, J. et al. The Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS) handbook: a guide to assess spondyloarthritis. **Ann Rheum Dis.** 2009 Jun;68 Suppl 2:ii1-44. doi: 10.1136/ard.2008.104018.

STOLWIJK, C. et al. Epidemiology of Spondyloarthritis. **Rheum Dis Clin North Am.**, v. 38, n. 3, p. 441-476, 2012.

TIBBLE, J. et al. A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. **Gut.**, v. 47, p. 506-513, 2000.

TORRES, J. et al. Crohn's disease. **Lancet.**, p. 1-15, 2016.

TURINA, M. C. et al. Calprotectin serum level is an independent marker for radiographic spinal progression in axial spondyloarthritis. **Ann Rheum Dis.**, v. 73, p. 1746-1748, 2014.

ULCERATIVE colitis. 2015. Disponível em: <http://www.gastrointestinalatlas.com/english/ulcerative_colitis.html>. Acesso em: 25 nov. 2015.

UNGARO, R. et al. Ulcerative colitis. **Lancet.**, p.1-15, 2016.

VAN DER HEIJDE, D. et al. 2016 update of the ASAS-EULAR management recommendations for axial spondyloarthritis. **Ann Rheum Dis.**, v. 76, p. 978-991, 2017.

VAN DER LINDEN, S. et al. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. **Arthritis Rheum.**, v. 27, p. 361-368, 1984.

VAN PRAET, L. et al. Degree of bone marrow oedema in sacroiliac joints of patients with axial spondyloarthritis is linked to gut inflammation and male sex: results from the GIANT cohort. **Ann Rheum Dis.**, v. 73, p. 1186-1189, 2014.

VAN PRAET, L. et al. Microscopic gut inflammation in axial spondyloarthritis: a multiparametric predictive model. **Ann Rheum Dis.**, v. 72, p. 414-417, 2013.

VAN PRAET, L. et al. The transition of acute to chronic bowel inflammation in spondyloarthritis. **Nat Rev Rheumatol.**, v. 8, p. 288-295, 2012.

VAN TUBERGEN, A. The changing clinical picture and epidemiology of spondyloarthritis. **Nat Rev Rheumatol.**, v. 11, p.110-118, 2015.

VAN TUBERGEN, A.; WEBER, U. Diagnosis and classification in spondyloarthritis: identifying a chameleon. **Nat Rev Rheumatol.**, v. 8, p. 253-261, 2012.

VOGL, T. et al. Mrp8 and Mrp 14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. **Nat Med.**, v. 13, p. 1042-1049, 2007.

WALKER, G. Faecal calprotectin effectively excludes inflammatory bowel disease in 789 symptomatic young adults with/without alarm symptoms: a prospective UK primary care cohort study. **Aliment Pharmacol Ther.**, p. 1-14, 2018. doi: 10.1111/apt.14563.

WAUGHT, N. et al. Faecal calprotectin testing for differentiating amongst inflammatory and non-inflammatory bowel diseases: systematic review and economic evaluation. **Health Technol Assess.**, v. 17, p. 1-211, 2013.

WRIGHT, V.; WATKINSON, G. The arthritis of ulcerative colitis. **Medicine**, v. 38, p. 243-259, 1959.

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

SOCIEDADE EVANGÉLICA
BENEFICENTE DE CURITIBA -
PR



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Calprotectina como marcador de doença inflamatória intestinal em pacientes com espondiloartrite

Pesquisador: Juliana Simioni

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 49552615.0.0000.0103

Instituição Proponente: SOCIEDADE EVANGELICA BENEFICENTE DE CURITIBA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.262.921

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo transversal observacional a ser realizado em 80 pacientes diagnosticados com espondiloartrite (espondilite anquilosante, artrite psoriásica, espondiloartrite indiferenciada, artrite reativa, espondiloartrite juvenil).

Serão excluídos do estudos pacientes que têm diagnóstico de doença de Crohn e retocolite ulcerativa, uma vez que já apresentam o diagnóstico de doença inflamatória intestinal e câncer colorretal. A calprotectina é um complexo proteico encontrado no citosol de neutrófilos, monócitos e queratinócitos e é um marcador da inflamação intestinal. Esta proteína pode ser quantificada nas fezes e é um marcador de doença inflamatória intestinal. Os pacientes que aceitarem participar da pesquisa, serão convidados a trazer uma amostra de fezes ao ambulatório na data de sua consulta, a qual será encaminhada ao laboratório para extração da calprotectina fecal destas amostras.

Será realizado dosagem de calprotectina através do método de

ELISA. Foi apresentado o protocolo de coleta de dados bem como os critérios de diagnósticos de espondiloartrite, espondilite anquilosante, artrite psoriásica, artrite psoriásica, artrite reativa e oligoartrite assimétrica de membros inferiores.

Os pacientes que apresentarem elevação na dosagem de calprotectina fecal acima de 350mcg/ml,

Endereço: Rua Padre Anchieta, 2770

Bairro: Bigorrilho

CEP: 80.730-000

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3240-5570

Fax: (41)3240-5584

E-mail: comite.etica@fepa.r.edu.br

SOCIEDADE EVANGÉLICA
BENEFICENTE DE CURITIBA -
PR



Continuação do Parecer: 1.262.921

CURITIBA, 06 de Outubro de 2015

Assinado por:
Carmen Australia Paredes Marcondes Ribas
(Coordenador)

Endereço: Rua Padre Anchieta, 2770
Bairro: Bigorrilho **CEP:** 80.730-000
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3240-5570 **Fax:** (41)3240-5584 **E-mail:** comite.etica@fepar.edu.br

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa **“Calprotectina fecal como biomarcador de inflamação intestinal em pacientes com espondiloartrite”**. Nesta pesquisa pretendemos avaliar se através da dosagem da calprotectina, proteína que será avaliada nas fezes, é possível identificar os pacientes com espondiloartrite que apresentam risco aumentado de ter inflamação intestinal. Os pacientes que apresentarem elevação da calprotectina fecal ou sintomas que possam sugerir inflamação intestinal, serão convidados a realizar exame de ileocolonoscopia. Para esta pesquisa adotaremos os seguintes procedimentos: **coleta de fezes, entrevista, avaliação clínica e coleta de dados do prontuário médico**. Os riscos envolvidos na pesquisa consistem em: **na coleta de sangue, desconforto da entrada e saída da agulha. Com relação a coleta de fezes e demais dados, o estudo não prevê riscos**. A pesquisa contribuirá para a **identificação de bactérias presentes no intestino de pacientes brasileiros com espondiloartrite possibilitando uma melhor compreensão do processo da doença com o potencial para contribuir para o desenvolvimento de novas terapias através da manipulação da flora intestinal**. Para participar deste estudo o Sr. (a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. O Sr. (a) terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar e a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízos, valendo a desistência a partir da data de formalização desta. A sua participação é voluntária, e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que o Sr. (a) é atendido (a) pelo pesquisador, que tratará a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados obtidos pela pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. O (A) Sr. (a) não será identificado (a) em nenhuma publicação que essa pesquisa possa resultar. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no Ambulatório de Reumatologia do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, e a outra será fornecida ao Sr. (a). Os dados, materiais e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resoluções Nº 466/12; 441/11 e a Portaria 2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para fins acadêmicos e científicos.

Eu, _____, portador do documento de Identidade fui informado (a) dos objetivos, métodos, riscos e benefícios da pesquisa **“Calprotectina fecal como biomarcador de inflamação intestinal em pacientes com espondiloartrite”**, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar. Declaro que concordo em participar desta pesquisa. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido assinado por mim e pelo pesquisador, que me deu a oportunidade de ler e esclarecer todas as minhas dúvidas.

Nome completo do participante

Data

Assinatura do participante

Em caso de dúvidas você poderá entrar em contato com o Pesquisador Responsável:

Nome completo do Pesquisador Responsável: Dra. Juliana Simioni e Dra. Thelma Skare

Telefones: +554132405476

E-mail: drajulianasimioni@gmail.com

Assinatura do pesquisador responsável

Data

“Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Sociedade Evangélica Beneficente de Curitiba. O Comitê de Ética é a instância que tem por objetivo defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. Dessa forma o comitê tem o papel de avaliar e monitorar o andamento do projeto de modo que a pesquisa respeite os princípios éticos de proteção aos direitos humanos, da dignidade, da autonomia, da não maleficência, da confidencialidade e da privacidade”.

CEP/SEB – Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Sociedade Evangélica Beneficente de Curitiba Rua padre Anchieta, nº 2770 – 3º andar Bairro: Bigorriho Curitiba/PR – cep: 80.730-000 Fone: (41) 3240-5570 e-mail: comite.etica@fepar.edu.br

ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO PARA ILEOCOLONOSCOPIA

 **ERASTO GAERTNER** HEG - Termo de Consentimento Exame Endoscópico

Paciente: 0 Prontuário: 0 Atendimento: 0 Prescrição: 0

Procedimento

Endoscopia Colonoscopia Retoflexível

Anamnese

Fuma ou faz uso de bebida de álcool? SIM NÃO

Tem hipertensão arterial ou diabetes? SIM NÃO Qual? _____

Tem doenças cardíacas ou pulmonares? SIM NÃO Qual? _____

Já fez cirurgias abdominais? SIM NÃO Qual? _____

Tem alergia a medicamento? SIM NÃO Qual? _____

Possibilidade de gravidez ou amamentação? SIM NÃO

Já recebeu anestesia? SIM NÃO

Medicamentos: _____

CONSENTIMENTO INFORMADO

Eu, abaixo assinado, declaro estar ciente da necessidade da realização de um exame endoscópico para o qual autorizo Dra. SUSAN LOUISE KAKITANI TAKATA (CRM-PR 26556) ou Dra. KELLY CRISTINA VIEIRA (CRM-PR 25389) e sua equipe a efetuar tal procedimento.

Declaro também estar adequadamente informado a respeito dos riscos inerentes de tal procedimento e das suas limitações, da eventual possibilidade de complicações pré e pós-exame, decorrentes de hemorragia, perfuração do trato gastrointestinal, de infecções e de fatores biológicos individuais dos riscos do uso anestésico e/ou de sedação e inclusive o possível surgimento de alterações orgânicas, psicológicas de caráter transitório ou definitivo e, muito raramente, morte.

Admito ser conhecedor de que a equipe por este instrumento autorizado, se utilizará do que existe de mais avançado e disponível para a realização do procedimento bem como tomará cuidados básicos de esterilização, de estabilidade transoperatória e preservação da vida. Declaro ainda estar ciente de que o procedimento efetuado poderá ser ampliado, reduzido, cancelado, alterado, requerer acessos diferentes dos previstos e técnicas anestésicas diversas da inicialmente proposta, tudo com o objetivo de, sob a visão médica, otimizar o tratamento.

Realmente, comprometo-me a seguir fielmente as orientações pré e pós-operatórias que me foram dadas estando condicionado a alta ambulatorial à respectiva autorização e a presença de pessoa legalmente responsável para acompanhamento até domicílio.

Diante do exposto, assino e apresento de livre e espontânea vontade, certo de ter sanado todas as dúvidas decorrentes do mesmo para que produza os efeitos legais.

Paciente ou responsável: _____ RG: _____

Carilba, ____/____/____ Assinatura: _____

Dra. Kelly Cristina Vieira
CRM: 25389

Dra. Susan Louise Kakitani Takata
CRM: 26556

Testemunha

*****ATENÇÃO*****
Este termo deverá ser apresentado juntamente com a prescrição no dia do exame.

Diretor(a) Técnico(a): Dr(a). João Soares Nunes CRM: 35013
Impresso em: 12/01/2018 10:57:28 Página 1 Gleondo CATE01668



DÚVIDAS MAIS FREQUENTES EM RELAÇÃO AO EXAME QUE VOCÊ IRÁ REALIZAR

ENDOSCOPIA DIGESTIVA ALTA**O que é uma endoscopia digestiva alta?**

É um exame que, através da passagem de um aparelho flexível fino pela boca, permite o diagnóstico de doenças do esôfago, estômago e duodeno. Ocasionalmente, no exame, pode ser realizado o próprio tratamento para algumas dessas doenças.

Qual a duração do exame?

É variável, mas dura em média 5 a 10 minutos, dependendo do procedimento.

É necessário algum preparo?

Sim. É necessário jejum absoluto de 12 horas, ou seja, não comer ou beber nada, nem água.

No dia do exame, como devo proceder?

Vir com acompanhante responsável maior de 18 anos. Não vir de moto. Chegar com antecedência de 15 minutos.

E após o exame?

Não conduzir nenhum tipo de veículo. Não fazer exercício físico ou atividades que exijam atenção. No dia do exame, deverá repousar em casa e não poderá ir ao trabalho ou escola.

COLONOSCOPIA**O que é colonoscopia?**

É um exame que avalia o cólon (intestino grosso) através da introdução de um aparelho flexível fino pelo ânus com objetivo de detectar alterações na mucosa.

É necessário algum preparo para o exame?

Sim. O paciente deverá fazer uma "limpeza intestinal" para que se possa fazer o exame adequadamente. Se, no momento do exame, o intestino estiver com fezes, o exame é cancelado e deverá ser remarcado. Você receberá uma folha em anexo, com a dieta e os medicamentos a serem usados para o preparo. Esses medicamentos causarão diarreia portanto é importante fazer o preparo com banheiro acessível.

Quanto tempo dura o exame?

Varia entre 15 a 60 minutos, dependendo de cada pessoa ou procedimento.

Existem situações onde durante a colonoscopia seja realizada cirurgia endoscópica?

Sim. Em caso de pólipos intestinais (lesões elevadas no intestino que podem ser ou evoluir para um tumor maligno) o médico endoscopista está autorizado a polipectomia, ou seja, retirada da lesão.

Quais as possíveis complicações deste exame?

Como o cólon não é tubo retilíneo, e sim cheio de curvas, o próprio exame é sujeito a raras complicações, como dor abdominal, náuseas e até perfuração intestinal. Se, durante o exame, é feito algum procedimento adicional, como polipectomia, pode ocorrer sangramento e perfuração também. Geralmente o sangramento é pequeno e para espontaneamente. No caso de perfuração, o médico tomará as medidas necessárias para resolução o mais rápido possível. O tratamento destas complicações pode ser endoscópico ou por cirurgia abdominal.

RETOSÍGMOIDOSCOPIA FLEXÍVEL**O que é retossigmoidoscopia flexível?**

O exame é parecido com a colonoscopia, porém avalia apenas os 40-50cm da parte final do intestino. As complicações possíveis são as mesmas, no entanto é um exame com duração mais curta, cerca de 10-15 minutos, dependendo do procedimento.

É necessário algum preparo para o exame?

Sim. O preparo é feito com fleet enema (substância utilizada via retal com efeito laxativo) para a limpeza da parte final do intestino. É necessário jejum de 8 horas para a sedação. Não é preciso fazer nenhuma dieta específica. Você receberá uma folha em anexo explicando o preparo.

DÚVIDAS GERAIS

Como devo proceder em caso de emergência a/ou complicação pós-exame? (ex: vômitos, prostração, febre, dor aguda, hemorragias, falta de ar...)

Nesses casos, deverá procurar pronto-atendimento com máxima urgência.

Entrar em contato com nosso serviço de endoscopia, ligar para o Telefone (41) 3361-5000 e pedir para que a telefonista transfira para o setor de endoscopia.

ANEXO D – BASDAI

BASDAI**(BATH ANKYLOSING SPONDYLITIS DISEASE ACTIVITY INDEX)**

Pontue os seguintes itens, considere como você se sentiu nos últimos 10 dias.

1 -Fadiga (informe o valor da EVA, de 0 a 10):

0—1—2—3—4—5—6—7—8—9—10.

1 - Dor pescoço, costas ou quadril (EVA 0 a 10):

0—1—2—3—4—5—6—7—8—9—10.

2 - Dor em outras articulações (EVA 0 a 10):

0—1—2—3—4—5—6—7—8—9—10.

3 - Desconforto ao toque em local de dor (EVA 0 a 10):

0—1—2—3—4—5—6—7—8—9—10.

4 Intensidade rigidez matinal (EVA 0 a 10):

0—1—2—3—4—5—6—7—8—9—10.

5 Duração rigidez matinal (EVA de zero a 120 min): 0-10- 10= duas horas ou mais

0—1—2—3—4—5—6—7—8—9—10.

Escore final= $1+2+3+4 + (5+6) / 2$

5

ANEXO E – BASFI**BASFI – (BATH ANKYLOSING SPONDYLITIS FUNCTIONAL INDEX)****Escore Final- média aritmética dos escores individuais****Você consegue:**

1 - Vestir meias ou meia-calça sem ajuda ou auxílio de aparelhos?

0—1—2—3—4—5—6—7—8—9—10.

2 -Curvar o corpo da cintura para cima para pegar uma caneta no chão sem o uso de instrumento de auxílio?

0—1—2—3—4—5—6—7—8—9—10.

3 -Alcançar uma prateleira alta sem ajuda ou auxílio de um instrumento?

0—1—2—3—4—5—6—7—8—9—10.

4 - Levantar-se de uma cadeira sem braços da sala de jantar sem usar suas mãos ou qualquer outro tipo de ajuda?

0—1—2—3—4—5—6—7—8—9—10.

5 - Levantar-se quando deitado de costas no chão sem ajuda?

0—1—2—3—4—5—6—7—8—9—10.

6 - Ficar em pé sem ajuda por 10 minutos sem desconforto?

0—1—2—3—4—5—6—7—8—9—10.

7 - Subir 12 a 15 degraus sem usar o corrimão ou outra forma de apoio (andador); um pé em cada degrau?

0—1—2—3—4—5—6—7—8—9—10.

8 - Olhar para trás, virando a cabeça sobre o seu ombro sem virar o corpo?

0—1—2—3—4—5—6—7—8—9—10.

9 - Fazer atividades que exijam esforço físico, isto é, fisioterapia, jardinagem ou esporte?

0—1—2—3—4—5—6—7—8—9—10.

10 - Ter um dia repleto de atividades, seja em casa ou no trabalho?

0—1—2—3—4—5—6—7—8—9—10.

ANEXO F – BASMI

BASMI

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tragus to wall (cm)	\leq 10	10- 12.9	13- 15.9	16- 18.9	19- 21.9	22- 24.9	25- 27.9	28- 30.9	31- 33.9	34- 36.9	\geq 37
Lumbar Flexion (cm)	\geq 7.0	6.4- 7.0	5.7- 6.3	5.0- 5.6	4.3- 4.9	3.6- 4.2	2.9- 3.5	2.2- 2.8	1.5- 2.1	0.8- 1.4	\leq 0.7
Intermalleolar distance (cm)	\geq 120	110- 119.9	100- 109.9	90- 99.9	80- 89.9	70- 79.9	60- 69.9	50- 59.9	40- 49.9	30- 39.9	\leq 30
Cervical Rotation (degrees)	\geq 85	76.6- 85	68.1- 76.5	59.6- 68	51.1- 59.5	42.6- 51	34.1- 42.5	25.6- 34	17.1- 25.5	8.6- 17	\leq 8.5
Lumbar Side Flexion (cm)	\geq 20	18- 20	15.9- 17.9	13.8- 15.8	11.7- 13.7	9.6- 11.6	7.5- 9.5	5.4- 7.4	3.3- 5.3	1.2- 3.2	\leq 1.2

ANEXO H – PROTOCOLO DE ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Diagnóstico anatomopatológico – Exame número

1- Biópsia de íleo:

- Mucosa ileal histologicamente preservada.
- Ileíte crônica linfoplasmocitária em grau discreto moderado intenso
- Infiltrado de eosinófilos ausente em quantidade pequena média grande
- Erosão epitelial ausente presente
- Hiperplasia linfoide ausente presente
- Granulomas epitelióides ausente presente

2- Biópsia de cólon ascendente:

- Mucosa colônica histologicamente preservada.
- Colite crônica linfoplasmocitária em grau discreto moderado intenso
- Infiltrado de eosinófilos ausente em quantidade pequena média grande
- Distribuição das células inflamatórias em toda a espessura da mucosa com predomínio na porção luminal da mucosa com predomínio na porção basal da mucosa.
- Erosão epitelial ausente presente
- Espessamento da zona da membrana basal ausente presente
- Hiperplasia linfoide ausente presente
- Granulomas epitelióides ausente presente

3- Biópsia de cólon transverso:

- Mucosa colônica histologicamente preservada.
- Colite crônica linfoplasmocitária em grau discreto moderado intenso
- Infiltrado de eosinófilos ausente em quantidade pequena média grande
- Distribuição das células inflamatórias em toda a espessura da mucosa com predomínio na porção luminal da mucosa com predomínio na porção basal da mucosa.
- Erosão epitelial ausente presente
- Espessamento da zona da membrana basal ausente presente
- Hiperplasia linfoide ausente presente
- Granulomas epitelióides ausente presente

4- Biópsia de cólon esquerdo:

- Mucosa colônica histologicamente preservada.
- Colite crônica linfoplasmocitária em grau discreto moderado intenso
- Infiltrado de eosinófilos ausente em quantidade pequena média grande
- Distribuição das células inflamatórias em toda a espessura da mucosa com predomínio na porção luminal da mucosa com predomínio na porção basal da mucosa.
- Erosão epitelial ausente presente
- Espessamento da zona da membrana basal ausente presente
- Hiperplasia linfoide ausente presente

Granulomas epitelióides ausente presente

5- Biópsia de mucosa de reto:

Mucosa retal histologicamente preservada.

Proctite crônica linfoplasmocitária em grau discreto moderado intenso

Infiltrado de eosinófilos ausente em quantidade pequena média grande

Distribuição das células inflamatórias em toda a espessura da mucosa com predomínio na porção luminal da mucosa com predomínio na porção basal da mucosa.

Erosão epitelial ausente presente

Espessamento da zona da membrana basal ausente presente

Hiperplasia linfoide ausente presente

Granulomas epitelióides ausente presente

ANEXO I – ARTIGO PUBLICADO

CLINICAL

Fecal Calprotectin, Gut Inflammation and Spondyloarthritis

Juliana Simioni,^{a,b} Thelma L. Skare,^a Ana Paula B. Campos,^a Lorete Kotze,^b Iara Messias-Reason,^b Sergio O. Ioshii,^c and Renato Nisihara^{a,b,d}

^aRheumatology Unit, Evangelical University Mackenzie of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

^bInternal Medicine Post Graduate, Clinical Hospital, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

^cDivision of Pathology, Federal University of Paraná, Postgraduate Program in Technology in Health, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, Paraná, Brazil

^dDepartment of Medicine, Positivo University, Curitiba, Paraná, Brazil

Received for publication November 26, 2018; accepted April 12, 2019 (ARCMED_2018_563).

Background. Gut inflammation is closely related to spondyloarthritis (SpA) pathophysiology. Fecal calprotectin has been used to measure the degree of gut inflammation. The phenotype of SpA may change according to studied population.

Aim. To study the fecal calprotectin levels in a sample of SpA in Brazilian patients and its relationship with epidemiological, clinical and treatment variables as well as with the macro and microscopic degree of gut inflammation.

Methods. Eighty five SpA patients were studied for epidemiological and clinical features, functional and inflammatory indexes and fecal calprotectin levels measured using a ELISA kit. Colonoscopy with intestinal biopsies were performed in 39 of them. At time of colonoscopy a second calprotectin level was done after suspension of at least 3 weeks of used anti-inflammatory nonsteroidal drugs (NSAIDs).

Results. Fecal calprotectin levels were higher in Ankylosing Spondylitis (AS) patients ($p < 0.0001$) and in those with axial involvement ($p = 0.002$). No relationship was found with SpA inflammatory and functional parameters (all $p = ns$). After suspension of NSAIDs, a drop in fecal calprotectin levels was observed (from median levels of 215.0–76.0 $\mu\text{g/g}$; $p = 0.01$). In the colonoscopy, 33.3% had macroscopic signs of inflammation and these patients had higher calprotectin ($p = 0.009$) than others. Microscopic examination showed that all patients had lymphoplasmacytic infiltrate and eosinophilic infiltrate; epithelial erosion was present in 27.2%.

Conclusions. Patients with ankylosing spondylitis and axial forms of diseases have higher fecal calprotectin levels. Patients with all types of SpA have microscopic inflammatory changes in the gut. © 2019 IMSS. Published by Elsevier Inc.

Key Words: Fecal calprotectin, Gut, Inflammation, Spondyloarthritis, Ankylosing spondylitis.

Introduction

Fecal calprotectin (FC) is a major cytosolic protein released during neutrophils activation and it is a relatively new marker for the inflammatory processes (1). Calprotectin is stable in feces (2). It reflects the increased neutrophil migration into the gut lumen across inflamed colonic and

small bowel mucosa (2–4). Therefore, FC levels are high among patients with active inflammatory bowel diseases, providing a diagnostic tool for differentiating between recurrent abdominal pain and chronic inflammatory disease in the intestine (5).

Gut inflammation is closely associated with chronic inflammatory joint diseases such as spondyloarthritis (SpA). (6) The meaning of FC values in this context are not completely clear, but some authors have found that it may predict the appearance of future inflammatory bowel disease associate with SpA. (7) Others have found correlation of their values with disease activity (7,8). However, most of studies

Address reprint requests to: Renato Nisihara, Medicine Department, Evangelical Mackenzie University of Paraná, R. Padre Agostinho, 2770, Curitiba, 80730-000, Brazil; Phone/FAX: (+55) (41) 32405500; E-mail: renatonisihara@gmail.com

are done in patients with ankylosing spondylitis and in European countries. SpA are diseases with phenotypes that change according to ethnic background (9,10). Likewise intestinal inflammation may suffer influence of dietary habits (11) and environmental factors (12).

Herein we aimed to study the value of FC dosage in a sample of different forms of SpA in patients from Brazil.

Methods

The Local Committee of Ethics in Research approved this study and all participants signed consent. To be included all patients should be over 18 years of age and fulfill the SpA diagnosis according to ASAS classification criteria (13). Patient's diagnosed with inflammatory bowel disease or any other chronic intestinal disease were excluded.

All patients answered a structured questionnaire that included epidemiological data and data on gastrointestinal symptoms (diarrhea, constipation, abdominal pain and blood in the stools). The charts were reviewed for SpA type, axial or peripheral involvement, disease duration, extra articular manifestations, HLA B27 presence, use of medications, and values of hemoglobin, C reactive protein (CRP), erythrocyte sedimentation rate (ESR). Patients were submitted to measurement of BASDAI (Bath Ankylosing Spondylitis index) (13), ASDAS ESR (Ankylosing Spondylitis disease Activity Score using ESR) (14), ASDAS CRP (Ankylosing Spondylitis disease Activity Score using CRP), (14) MASES (Maastricht Ankylosing Spondylitis Score), (15) BASMI (Bath Ankylosing Spondylitis metrological index) (13), BASFI (Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index) (13), ASQoL (Ankylosing Spondylitis quality of life questionnaire) (16,17) and HAQ (Health Assessment Questionnaire) (18). At this time, a stool sample was collected for calprotectin mensuration.

The FC were measured using a commercial ELISA kit (Bühlmann, Basel, Switzerland). After a short extraction procedure using 50 mg of feces and 2.5 mL of extraction buffer, the selective measurement of FC by sandwich ELISA was performed. Briefly, a monoclonal capture antibody specific to FC heterodimeric and polymeric complexes is coated onto the microtiter plate. Calibrators, controls and patients extracts diluted 1:50 were incubated at room temperature for 30 minutes. After a washing step, a detection antibody conjugated to horseradish peroxidase was added. After incubation and a further washing step, tetramethylbenzidine was added, followed by a stopping reaction. The absorption was measured at 450 nm with Bio-tek Instruments, Inc. ELX 800 (USA) (19). In according with manufacturer instructions, values below 50 µg/g are not indicative of inflammation in the gastrointestinal tract. Levels between 50–200 µg/g are considered undetermined and suggestive of repeating measurement and performing further investigations. FC values above 200 µg/g are

indicative of active organic disease with inflammation of the gastrointestinal tract (19).

All patients were invited to do a colonoscopy with intestinal biopsy of terminal ileum, ascendant transverse and descendent colon and rectum. A single pathologist, blind to clinical and colonoscopy findings, examined all biopsy samples, searching for lymphoplasmacytic infiltrate, eosinophil infiltrate, epithelial erosions, lymphoid hyperplasia and granulomas in hematoxylin-eosin staining. At time of colonoscopy, all patients that were previously using AINHS had their medication stopped for, at least, 21 d. A new sample for measure of FC was collected simultaneously with colonoscopy.

Data was collected in frequency and contingency tables. Shapiro Wilk test was used to judge data distribution and central tendency was expressed in mean and standard deviation or median and interquartile range (IQR) according to the distribution of studied data. Comparison studies were done by Fisher and χ^2 tests when data was nominal and for Mann Whitney and Kruskal Wallis tests when numeric. Correlation studies were done by Spearman test. Multiple regression was applied to study independency of variables. The software Medcalc 10.0 was used for tests calculations. The adopted significance was of 5%.

Results

Description of Studied Sample

Eighty-five patients were included: 55/85 (64.7%) males and 30/85 (35.2%) females. The median age was 49.3 ± 11.9 years and the median disease duration of 14 years. In this sample 40/85 (47%) were non-smokers, 65/85 (76.4%) auto declared Caucasians and 20/85 (23.5) auto declared Afro-descendants. The clinical profile and used treatment of the studied sample is in Table 1.

In this sample, 21/85 (29.4%) had gastrointestinal complaints: abdominal pain in 5/85 (5.8%), hematochezia in 8/85 (9.4%), diarrhea in 8/85 (9.4%) and intestinal constipation in 8/85 (9.4%). The FC values ranged from 18 to 1346 µg/g (median 92.0; IQR = 48.0–183.0). In 24/85 (28.2%) the FC was <50 µg/g; in 43/85 (50.5%), the values were between 50 and 200 µg/g and in 18/85 (21.2%) FC values were >200 µg/g.

Study of Fecal Calprotectin Values According to Epidemiological, Clinical and Treatment Variables

The comparison of FC values according to SpA type and involvement type are on Figure 1. The ankylosing spondylitis and patients with axial involvement had higher values than the others did.

Studying the FC values according to ethnic background, gender, presence of HLA B27 and tobacco use no differences were found (all $p = ns$). Patients with skin lesions

Table 1. Clinical and treatment profile of studied SpA (Spondyloarthritis) sample ($n = 85$)

	<i>n</i>
SpA type	
Ankylosing Spondylitis	52/85 (61.1%)
Psoriatic arthritis	18/85 (21.1%)
Undifferentiated form	5/85 (5.8%)
Non radiographic SpA	5/85 (5.8%)
Juvenile SpA	4/85 (4.7%)
Reactive arthritis	1/85 (1.1%)
Involvement type	
Axial	36/85 (42.3%)
Peripheral	10/85 (11.7%)
MIXed	39/85 (45.8%)
HLA B27 Positive	45/65 (69.2%)
Median hemoglobine g/dL (IQR)	14.4 (12.7–15.2)
Median ESR mm/h (IQR)	23.5 (9.5–40.0)
Median C Reactive protein mg/dL (IQR)	8.0 (2.8–20.0)
Mean ASDAS ESR	2.68 ± 1.18
Mean ASDAS CRP	2.51 ± 1.02
Median BASDAI (IQR)	2.4 (1.6–4.3)
Median BASMI (IQR)	4.5 (2.6–6.0)
Median MASES (IQR)	0 (0–4.0)
Median BASFI (IQR)	5.1 (2.5–7.2)
Median ASQoL (IQR)	9.15 ± 4.78
Mean HAQ	0.99 ± 0.66
Treatment	
Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID)	
Intermittent use	5/85 (5.8%)
Continuous	22/85 (25.8%)
Glucocorticoid (dose 5–20 mg prednisone/day)	4/85 (4.7%)
DMARDs	
Sulphasalazine	8/85 (9.4%)
Methotrexate	16/85 (18.8%)
Anti TNF- α	38/45 (44.7%)
Etanercept	15/85 (17.6%)
Infliximab	5/85 (5.8%)
Adalimumab	16/85 (18.8%)
Certolizumab	1/85 (1.2%)
Golimumab	1/85 (1.2%)

IQR = interquartile rate; ESR- erythrocyte sedimentation rate; ASDAS = Ankylosing Spondylitis disease Activity Score; BASDAI = Bath Ankylosing Spondylitis index; BASMI = Bath Ankylosing Spondylitis metrological index MASES = Maastricht Ankylosing Spondylitis Score; BASFI = Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index; ASQoL = Ankylosing Spondylitis quality of life questionnaire; HAQ = Health Assesment Questionnaire; DMARD = disease modifying rheumatic drugs.

had lower levels than those without it (median of 53.0 $\mu\text{g/g}$ vs. 106.0 $\mu\text{g/g}$; $p = 0.0004$) and patients with uveitis had higher values than those without it (median of 121 $\mu\text{g/g}$ versus median of 74.5 $\mu\text{g/g}$; $p = 0.04$).

None of gastrointestinal complaints could be linked to FC values (all $p = ns$). Also, the use of medications (including NSAIDs or nonsteroidal anti-inflammatory drugs) did not influence the values of FC in the studied sample as seen in Table 2.

Correlation studies of FC values with hemoglobin, ESR, CRP, ASDAS ESR, ASDAS CRP, BASDAI, BASFI, BASMI, MASES, ASQoL, HAQ were non-significant (all $p = ns$).

As the FC values were positively associated with diagnosis of ankylosing spondylitis, axial involvement, presence of uveitis and negatively associated with skin lesions, a multiple regression was done to access independence of variables and only the diagnosis of ankylosing spondylitis ($p = 0.03$) and axial involvement ($p = 0.04$) remained significant.

During the study, one patient with very high FC levels (1.346 $\mu\text{g/g}$) developed full blown inflammatory bowel disease and was excluded from further examinations. This patient was using certolizumab at time of inflammatory bowel disease diagnosis.

Study of Colonoscopy and Histologic Findings and A Second Dosage of Calprotectin

Thirty-nine patients agreed with the realization of colonoscopy (58.9% with ankylosing spondylitis; 17.9% with psoriatic arthritis and 23.0% of others). None of these patients was on NSAIDs for, at least, four weeks. In 38.4%, anti-TNF- α treatment was used (10.2% with etanercept), 15.3% were on methotrexate and 12.8% on sulphasalazine. A new dosage of FC was done and showed values > 200 $\mu\text{g/g}$ in 12%; values between 50–200 $\mu\text{g/g}$ in 48% and < 50 $\mu\text{g/g}$ in 40%.

Isolating the patients subgroup that used NSAIDs during the first dosage, we found that the median value of FC when using these drugs was 215.0 $\mu\text{g/g}$ (IQR = 67.0–405.0 $\mu\text{g/g}$) and when not using them was 76.0 $\mu\text{g/g}$ (IQR = 42.7–116.3 $\mu\text{g/g}$) with $p = 0.01$.

Restudying inflammatory and functional parameters with the FC, in patients without NSAIDs, we did not found any association with BASDAI, ASDAS ESR, ASDAS CRP, MASES, BASMI, BASFI, HAQ, ASQoL, CRP, ESR and hemoglobin (all $p = ns$).

In this sample, 33.3% had macroscopic inflammation; 25.6% had polyps; 17.9% had diverticula; and 41.0% were macroscopically normal.

Histological studies showed that none of the patients had normal mucosa; 27.2% had epithelial erosions; 100% had lymphoplasmacytic infiltrate; 100% had eosinophilic infiltrate; 92.5% had lymphoid hyperplasia; none had epithelioid granulomas and none had thickening of the basement membrane. Details of histological findings are in Table 3.

FC was higher in patients with macroscopic inflammation at colonoscopy (median value of 138 $\mu\text{g/g}$ in those with inflammation versus 39 $\mu\text{g/g}$ in those without inflammation with $p = 0.009$). The histological finding of mucosal erosion did not modify the values of FC in a statically significant manner (median values of 102 $\mu\text{g/g}$ in those with and 50.5 $\mu\text{g/g}$ in those without it, with $p = 0.51$). FC values according to the presence of lymphoplasmacytic infiltrate or eosinophilic infiltrate could not be analyzed, as these findings were almost universal.

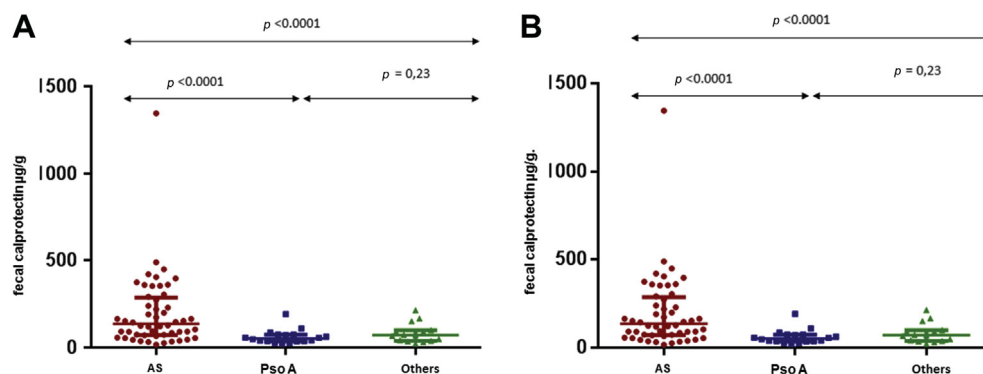


Figure 1. A). Fecal calprotectin according spondyloarthritis (SpA) type. Ankylosing spondylitis (AS): Median 137.0 µg/mL. Psoriatic arthritis (Pso A): Median of 53.0 µg/mL. Others: Median 73.0 µg/mL; $p < 0.0001$. (B). Fecal calprotectin according to local of involvement. Note: Axial form: Median of 152.0 µg/mL. Peripheral form: Median of 73.0 µg/mL. Mixed form: Median of 74 µg/mL; $p = 0.002$.

Discussion

Our results showed that FC levels are linked to the diagnoses of ankylosing spondylitis and musculoskeletal axial involvement. We are not able not associate FC levels neither to disease activity or functional impairment. It also showed, as expected, that patients with the presence of macroscopic inflammation have higher FC although the association with the microscopic findings could not be properly studied. Histological erosion did not affect FC ($p = 0.51$) but there was important difference in the median levels of this biomarker (102 µg/g vs. 50.2 µg/g). It is possible that our sample did not have enough strength to show this difference, as only six patients had this histological finding. It was also observed that eosinophilic and lymphoplasmacytic infiltrates are almost universal in all SpA patients.

Finding higher levels of FC in SpA patients with predominant axial involvement and knowing that its values are associated with mucosal inflammation, may allow the hypothesis that the gut participation is more important in the pathophysiology of axial than in the peripheral forms of the disease. Axial forms have strong enthesal participation (20) while in the peripheral, synovitis are also important. Prostaglandin E2, fostering the production of

interleukins (IL) from IL23-IL17 axis, plays a key role in the enthesis inflammation. In mice IL-23 responsive cells are identified at enthesal sites (21,22). These mediators leads to the influx of innate immune cells and homing of inflammation into the entheses, which is followed by mesenchymal tissue responses and new bone formation (23). According to Sherlock JP, et al. (21), IL-23 promotes highly specific enthesal inflammation by acting on a population of CD3+CD4-CD8- enthesal resident lymphocytes and the expression of this cytokine alone, in the absence of any other inflammatory signal, is enough to generate classical features of SpA. IL-23 is active at mucosal surfaces and it is produced by the gut, suggesting that the intestinal mucosa could be a main site of IL-23 production in this context (24).

We did not find any association of FC with disease activity showing that, although intestinal inflammation may be very important in the initiation of SpA pathophysiology, it may not be as important in keeping the disease activity. However, others found contrasting results. Moreno-Martínez MJ, et al. (25), studying 33 SpA patients from Spain, found association of FC with CRP but not with any other inflammatory parameters. Klinberg et al (7) found that fecal calprotectin was positively and significantly correlated with parameters reflecting high disease activity.

Table 2. Fecal calprotectin values according to used medications in 85 Spondyloarthritis patients

	Median calprotectin (µg/g) in patients with the drug	Median calprotectin (µg/g) in patients without the drug	<i>p</i>
Anti-inflammatory nonsteroidal drugs (NSAIDs)			
Continuous use	84.0 (46.0–234.3)	92.0 (48.0–159.5)	0.69
Intermittent use	76.0 (61.5–227.0)	92.0 (61.5–227.0)	0.95
DMARDs (disease modifying rheumatic drugs)			
Methotrexate	75.0 (38–215.0)	123.0 (62.5–220.5)	0.29
Sulphasalazine	135.5 (94.2–186.0)	85.0 (44.0–183.5)	0.16
Anti TNF α drugs			
Any	92.5 (49.0–194.3)	92.0 (49.0–193.0)	0.88
Etanercept	126.0 (55.0–174.0)	91.0 (49.0–192.0)	0.57
Monoclonal antibodies	69.0 (41.2–207.3)	91.0 (49.0–192.0)	0.53

Table 3. Histological findings in intestinal mucosal biopsy of Spondyloarthritis patients

Terminal ileum	
Normal mucosa	-7.4%
Lymphoplasmacytic infiltrate	Discrete -70.3%
	Moderated -22.2%
	Intense -0
Epithelial erosion	11.1%
Lymphoid hyperplasia	55.5%
Right colon	
Normal mucosa	0
Lymphoplasmacytic infiltrate	Discrete -29.6%
	Moderated -70.3%
	Intense -0
Eosinophilic infiltrate	Discrete -62.9%
	Moderated -22.2%
	Intense -0
Epithelial erosion	0
Lymphoid hyperplasia	22.2%
Transverse colon	
Normal mucosa	11.1%
Lymphoplasmacytic infiltrate	Discrete -37.7%
	Moderated -51.8%
	Intense -0
Eosinophilic infiltrate	Discrete -55.5%
	Moderated -25.9%
	Intense -0
Epithelial erosion	0
Lymphoid hyperplasia	29.6%
Left colon	
Normal mucosa	0
Lymphoplasmacytic infiltrate	Discrete -52.8%
	Moderated -48.1%
	Intense -0
Eosinophilic infiltrate	Discrete -66.6%
	Moderated -25.9%
	Intense -0
Epithelial erosion	0
Lymphoid hyperplasia	40.7%
Rectum	
Normal mucosa	0
Lymphoplasmacytic infiltrate	Discrete -77.7%
	Moderated -25.9%
	Intense -0
Eosinophilic infiltrate	Discrete -25.9%
	Moderated -74.0%
	Intense -0
Epithelial erosion	11.1%
Lymphoid hyperplasia	29.6%

None of studied segment had epithelioid granuloma, neither thickening of the basement membrane. All inflammatory infiltrates either were located in the luminal portion or distributed throughout the thickness of the mucosa. None had predominant basal localization.

Østgård et al, (26) studying 15 SpA patients with BASDAI ≥ 4 , found that patients with elevated FC had more inflammation in the sacroiliac joints on MRI. It is possible that we could not demonstrate this association because several of our patients were using anti-TNF α drugs and this may have blunted the possible association. In addition, it may be important to note that our sample included several types of SpA, some with peripheral predominance, and not only

ankylosing spondylitis as most of the previous studies did. Yet, the coexistence of intestinal parasitosis and its interference in local inflammatory parameters may modify the FC values. Helminths are common in low and middle-income countries as ours (27). They secrete several molecules that can modulate the immune responses, favoring their evasion and perpetuate their survival in the host but that also interferes with local inflammatory responses (28). This is one of explanations why inflammatory bowel diseases are more common in industrialized countries. However, this issue needs further studies.

In the present study, it was not possible to note differences in FC levels with NSAIDs use at first dosage. Nevertheless, when we compared the first measurement with the second, where these medications have been withdrawn, we found statistical significance. The use of these medications is a major source of concern in the interpretation of FC values due to their actions in gastrointestinal mucosa. Several works have found that NSAIDs causes elevation in FC. (7,29). Klingberg E, et al. (7) noted that 3 week cessation of NSAIDs resulted in a drop of a median 116 mg/kg in FC. On the other hand, a study in Spain did not demonstrate association modifications in FC levels by NSAIDs (25) as well as another by Matzkies FG, et al. (30).

Finally, we found that inflammatory infiltrates are almost universal in our sample. This is interesting as our sample had several types of SpA and not only ankylosing spondylitis showing that intestinal inflammation is present in all types of SpA, including psoriatic arthritis. In psoriasis, skin microbioma alterations are considered important (31). However, Codoñer FM, et al. (32) found that intestinal microbioma in psoriasis patients is clearly different from those of healthy population. Our study corroborates the gut participation in this complex disease.

Concluding, we highlight that in our investigation patients with ankylosing spondylitis and axial forms of diseases have higher FC levels. In addition, that patients with all types of SpA have microscopic inflammatory changes in the gut.

References

1. John B, Fagerhol MK, Lyberg T, et al. Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. *Mol Pathol* 1997;50: 113–123.
2. Sipponen T, Savilahti E, Kolho KL, et al. Crohn's disease activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrin: correlation with Crohn's disease activity index and endoscopic findings. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:40–46.
3. Sipponen T, Kärkkäinen P, Savilahti E, et al. Correlation of faecal calprotectin and lactoferrin with an endoscopic score for Crohn's disease and histological findings. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;28:1221–1229.
4. Konikoff MR, Denson LA. Role of fecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:524–534.
5. Henderson P, Casey A, Lawrence SJ, et al. The diagnostic accuracy of fecal calprotectin during the investigation of suspected pediatric

- inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2012;107:941–949.
6. Speca S, Dubuquoy L. Chronic bowel inflammation and inflammatory joint disease: pathophysiology. *Joint Bone Spine* 2017;84:417–420.
 7. Klingberg E, Strid H, Ståhl A, et al. A longitudinal study of fecal calprotectin and the development of inflammatory bowel disease in ankylosing spondylitis. *Arthritis Res Ther* 2017;19:21.
 8. Duran A, Kobak S, Sen N, et al. Fecal calprotectin is associated with disease activity in patients with ankylosing spondylitis. *Bosn J Basic Med Sci* 2016;16:71–74.
 9. Ribeiro SLE, de Campos APB, Palominos PE, et al. Different ethnic background is associated with distinct clinical profiles in the spondyloarthritides in the North and South of Brazil. *Clin Rheumatol* 2019;38:195–203.
 10. Benegas M, Muñoz-Gomariz E, Font P, et al. RESPONDIA group; ASPECT study group; REGISPONSER study group. Comparison of the clinical expression of patients with ankylosing spondylitis from Europe and Latin America. *J Rheumatol* 2012;39:2315–2320.
 11. Jiang Z, Jacob JA, Li J, et al. Influence of diet and dietary nanoparticles on gut dysbiosis. *Microb Pathog* 2018;118:61–65.
 12. Mello CS, Rodrigues MSDC, Filho HBA, et al. Fecal microbiota analysis of children with small intestinal bacterial overgrowth among residents of an urban slum in Brazil. *J Pediatr (Rio J)* 2017;94:483–490.
 13. Sieper J, Rudwaleit M, Baraliakos X, et al. The Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS) handbook: a guide to assess spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis* 2009;68(Suppl II):ii1–ii44.
 14. Lukas C, Landewé R, Sieper J, et al. Development of an ASAS-endorsed disease activity score (ASDAS) in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2009;68:18–24.
 15. Heuft-Dorenbosch L, Spoorenberg A, van Tubergen A, et al. Assessment of enthesitis in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2003;62:127–132.
 16. Shinjo SK, Gonçalves R, Kowalski S, et al. Brazilian-Portuguese version and applicability questionnaire of the mobility index for ankylosing spondylitis. *Clinics (Sao Paulo)* 2007;62:139–144.
 17. Doward LC, Spoorenberg A, Cook SA, et al. Development of the AS-QoL: a quality of life instrument specific to ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2003;62:20–26.
 18. Ferraz MB, Oliveira LM, Araujo PMP, et al. Crosscultural reliability of the physical ability dimension of the Health Assessment Questionnaire. *J Rheumatol* 1990;17:813–817.
 19. Kotze LM, Nisihara RM, Marion SB, et al. Fecal Calprotectin: levels for the ethiological diagnosis in Brazilian patients with gastrointestinal symptoms. *Arq Gastroenterol* 2015;52:50–54.
 20. Miceli-Richard C. Enthesitis: The clue to the pathogenesis of spondyloarthritis? *Joint Bone Spine* 2015;82:402–405.
 21. Sherlock JP, Joyce-Shaikh B, Turner SP, et al. IL-23 induces spondyloarthropathy by acting on ROR- γ + CD3+CD4-CD8- enthesal resident T cells. *Nat Med* 2012;18:1069–1076.
 22. Reinhardt A, Yevsa T, Worbs T, et al. Interleukin-23-dependent γ/δ T cells produce interleukin-17 and accumulate in the enthesis, aortic valve, and ciliary body in mice. *Arthritis Rheumatol* 2016;68:2476–2486.
 23. Schett G, Lories RJ, D'Agostino MA, et al. Enthesitis: from pathophysiology to treatment. *Nat Rev Rheumatol* 2017;13:731–741.
 24. Becker C, Wirtz S, Blessing M, et al. Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells. *J Clin Invest* 2003;112:693–706.
 25. Moreno Martínez MJ, Moreno Ramos MJ, Linares Ferrando LF. Relationship between fecal calprotectin, anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies and other markers of disease activity in patients with spondyloarthritis. *Reumatol Clin* 2018;17:30301–30307.
 26. Østgård RD, Deleuran BW, Dam MY, et al. Faecal calprotectin detects subclinical bowel inflammation and may predict treatment response in spondyloarthritis. *Scand J Rheumatol* 2018;47:48–55.
 27. Varyani F, Fleming JO, Maizels RM. Helminths in the gastrointestinal tract as modulators of immunity and pathology. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2017;312:G537–G549.
 28. Soares MF, Araújo CA. Helminth products as a potential therapeutic strategy for inflammatory diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2008;7:113–118.
 29. Aalto K, Lahdenne P, Kolho KL. Fecal calprotectin in juvenile idiopathic arthritis patients related to drug use. *Pediatr Rheumatol Online J* 2017;15:9.
 30. Matzkies FG, Targan SR, Berel D, et al. Markers of intestinal inflammation in patients with ankylosing spondylitis: a pilot study. *Arthritis Res Ther* 2012;14:R261.
 31. Wang WM, Jin HZ. Skin microbiome: an actor in the pathogenesis of psoriasis. *Chin Med J (Engl)* 2018;131:95–98.
 32. Codoñer FM, Ramírez-Bosca A, Climent E, et al. Gut microbial composition in patients with psoriasis. *Sci Rep* 2018;8:3812.