FERNANDO SCHAPPO

**Pesquisa de anticorpos contra estruturas citoplasmáticas do
neutrófilo (ANCA) e contra o Saccharomyces cerevisiae (ASCA)
na doença inflamatória intestinal**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Gastroenterologia Clínica

Orientador: Dr. Aderson Omar Mourão Cintra Damião

São Paulo
2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Schappo, Fernando

Pesquisa de anticorpos contra estruturas citoplasmáticas do neutrófilo (ANCA) e contra o *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) na doença inflamatória intestinal / Fernando Schappo. -- São Paulo, 2007.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Gastroenterologia.

Área de concentração: Gastroenterologia Clínica.

Orientador: Adérson Omar Mourão Cintra Damião.

Descritores: 1.Doença de Crohn 2.Colite ulcerativa 3.Anticorpos anticitoplasma de neutrófilos 4.*Saccharomyces cerevisiae* 5.Marcadores biológicos

USP/FM/SBD-097/07

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, em especial, aos meus queridos pais Ilhete e Fidélis, meu prezado irmão Márcio e sua adorável esposa Marisa e também aos ainda pequenos Rodrigo e João Vítor, que sempre acreditaram em meu esforço e me apoiaram incondicionalmente em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de modo direto e indireto colaboraram na realização deste trabalho. Em especial agradeço:

À bióloga Cleonice Bueno, funcionária do Laboratório de Investigação Médica em Reumatologia – LIM 17, pela inestimável ajuda, paciência, disponibilidade e bondade, sem a qual não teria sido possível a conclusão deste trabalho.

Ao Dr. Aderson Omar Damião Cintra Mourão, Assistente Doutor da Disciplina de Gastroenterologia Clínica da FMUSP, meu orientador, por ter me guiado de forma serena e objetiva até a conclusão de nosso trabalho.

À Dra. Maraci Rodrigues, Assistente Doutora da Disciplina de Gastroenterologia Clínica da FMUSP, pela grande colaboração e ajuda prestada para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Aytan Miranda Sipahy, Assistente Doutor da Disciplina de Gastroenterologia Clínica da FMUSP, pela sua contribuição nesta pesquisa através de críticas construtivas e importantes sugestões.

Ao Dr. André Zonetti Arruda Leite, médico assistente da Disciplina de Gastroenterologia clínica da FMUSP, pelos ensinamentos em gastroenterologia transmitidos durante o período da pós-graduação.

À bióloga Maria Laura Laçava Lordello, à também bióloga Fabiana Maria dos Santos, à farmacêutica Carmen Lúcia Ortiz Agostinho e à técnica de laboratório Ieda Nishitokukado, pessoas maravilhosas e profissionais competentes, com quem tive o prazer de conviver durante o período da pós-graduação e que muito me ensinaram, ajudaram e incentivaram na realização deste trabalho, as quais serei sempre grato.

A todos os meus colegas pós-graduandos, residentes e estagiários que freqüentaram o Serviço de Gastroenterologia, pelo convívio harmonioso e auxílio para obtenção dos dados relevantes para a casuística deste trabalho.

A todos os funcionários do Ambulatório de Gastroenterologia – Grupo de Intestino e da Disciplina de Gastroenterologia Clínica da FMUSP, que contribuíram de forma indireta, porém não menos importante.

Aos meus preceptores da época em que fui residente de clínica médica, gastroenterologia clínica e endoscopia, pelos ensinamentos transmitidos, que contribuíram para a minha formação profissional e acadêmica.

Ao Dr. Joel de Oliveira, médico, meu tio, profissional competente e acima de tudo ético, a quem possuo gratidão não só pelos primeiros ensinamentos em medicina passados, mas também pelo carinho e acolhimento e que sem dúvida contribuiu para a conclusão de mais uma etapa importante em minha vida acadêmica e profissional.

Aos meus amigos Renato Almada Alonso e Luís Octávio da Silva, pelos ensinamentos principalmente na área de informática indispensáveis para a realização da dissertação, pela enorme paciência, disponibilidade, apoio e demonstração de amizade, que muito me ajudaram na conclusão deste trabalho.

Às minhas grandes amigas, Dra. Claudinete Simplicio de Góes, Dra. Adriana Falcão e Dra. Daniella Serafim Couto Vieira, médicas, profissionais que agregam humildade e competência, que me acompanham desde o início de minha jornada acadêmica e que sempre me incentivaram na realização deste trabalho.

Aos pacientes, que são sem dúvida alguma, os principais incentivadores para o aprimoramento não só profissional, mas pessoal, e a quem sempre devemos nos dedicar.

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

INTRODUÇÃO	1
ANCA.....	7
ASCA	11
OBJETIVOS	13
CASUÍSTICA E MÉTODOS	15
Detecção de ANCA	18
Detecção de ASCA.....	18
Descrição da análise estatística	20
RESULTADOS	22
1. Prevalência de pesquisa positiva para P-ANCA	23
2. Prevalência de pesquisa positiva para ASCA – IgA	24
3. Prevalência de pesquisa positiva para ASCA – IgG	24
4. Pesquisa de ASCA – combinação de IgA e IgG	25
5. Medidas de desempenho das pesquisas de P-ANCA e ASCA para distinguir os pacientes com doença inflamatória intestinal (RCUI + DC) dos sujeitos sem doença inflamatória intestinal.....	27
6. Medidas de desempenho das pesquisas de P-ANCA e ASCA para distinguir os pacientes com doença de Crohn daqueles com retocolite ulcerativa inespecífica	28
7. Análise das características demográficas, clínicas e sorológicas.....	29
DISCUSSÃO	40
CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS	55
APÊNDICE	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Prevalência dos marcadores sorológicos P-ANCA e ASCA na população estudada (n = 254)	26
Figura 2	Distribuição dos pacientes segundo apresentação e localização da doença	31
Figura 3	Distribuição dos pacientes segundo gravidade e doença	32
Figura 4	Distribuição dos pacientes segundo cirurgia e doença	32
Figura 5	Distribuição dos pacientes segundo utilização de imunossupressores e doença	33
Figura 6	Distribuição dos pacientes com DC e uso de drogas imunossupressoras em relação à presença do ASCA.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Medidas de desempenho (e respectivos intervalos de confiança) das pesquisas de pANCA e ASCA para distinguir pacientes com doença inflamatória intestinal (n = 200) dos sujeitos sem doença inflamatória intestinal (n = 54)	27
Tabela 2	Medidas de desempenho (e respectivos intervalos de confiança) das pesquisas de P-ANCA e ASCA para distinguir pacientes com doença de Crohn (n = 102) daqueles com retocolite ulcerativa inespecífica (n = 98).....	28
Tabela 3	Características sócio-demográficas, clínicas e sorológicas dos pacientes com doença inflamatória intestinal (n = 180)	29
Tabela 4	Localização e apresentação das lesões dos pacientes com doença inflamatória intestinal (n = 180)	30
Tabela 5	Média e desvio padrão de idade, idade de início dos sintomas e idade na época do diagnóstico dos pacientes com doença inflamatória intestinal (n=180)	33
Tabela 6A	Relação entre características sócio-demográficas, clínicas e sorológicas dos pacientes com RCUI e P-ANCA	34
Tabela 6B	Relação entre características sócio-demográficas, clínicas e sorológicas dos pacientes com RCUI e ASCA	35
Tabela 7A	Relação entre características sócio-demográficas, clínicas e sorológicas dos pacientes com DC e ASCA	36
Tabela 7B	Relação entre características sócio-demográficas, clínicas e sorológicas dos pacientes com DC e P-ANCA	38
Tabela 8	Prevalência de ASCA e P-ANCA na DII de acordo com vários autores	43
Tabela 9	Acurácia do P-ANCA e ASCA para diferenciar RCUI de DC em pacientes com DII	45

Schappo F. *Pesquisa de anticorpos contra estruturas citoplasmáticas do neutrófilo (ANCA) e contra o Saccharomyces cerevisiae (ASCA) na doença inflamatória intestinal* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 62p.

A determinação dos marcadores sorológicos **P-ANCA** (anticorpo perinuclear contra estruturas citoplasmáticas do neutrófilo) e **ASCA** (anticorpo anti-*Saccharomyces cerevisiae*) auxilia de forma menos invasiva no diagnóstico da doença inflamatória intestinal (DII). O padrão de associação mais relacionado à retocolite ulcerativa inespecífica (RCUI) ocorre com ASCA- (negativo) e P-ANCA + (positivo). Na doença de Crohn (DC) ocorre o contrário, ou seja, ASCA+ e P-ANCA-. O P-ANCA é determinado por imunofluorescência indireta usando neutrófilos fixados em etanol, e o ASCA através de ELISA. De forma geral, a prevalência do P-ANCA em pacientes com RCUI tem variado entre 50 e 80% e em pacientes com DC entre 10 e 30%. Controles sadios têm revelado prevalência menor que 4% e controles patológicos em torno de 8%. Alguns trabalhos mostraram ampla variação nos resultados, sugerindo além de variação genéticas, variações metodológicas de acordo com a população estudada. Foram realizadas análises no soro de 200 pacientes para pesquisa de P-ANCA e ASCA, sendo 98 com RCUI e 102 com DC. O grupo controle foi representado por 54 indivíduos sadios. Os pacientes com DII foram oriundos do ambulatório de Gastroenterologia – Grupo de Intestino do Hospital das Clínicas Faculdade da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). A prevalência encontrada do P-ANCA na RCUI, DC e grupo controle correspondeu a 61,2%, 16,7% e 5,6% respectivamente, enquanto que a do ASCA para a DC, RCUI e grupo controle correspondeu a 52,9%, 27,6% e 5,6% respectivamente. A sensibilidade e especificidade encontrada com o padrão ASCA+/P-ANCA- para DC foi de 45,1% e 89,% respectivamente, enquanto que para o padrão P-ANCA+/ASCA- para RCUI foi de 43,9% e 91,2% respectivamente. No que diz respeito às características clínicas e demográficas, nenhuma associação com a presença dos anticorpos foi estabelecida no presente estudo, exceto quando avaliado o uso de drogas imunossupressoras e infliximab em pacientes com DC e ASCA+ , a qual se mostrou aumentada ($p=0,008$). Assim sendo, a determinação dos anticorpos P-ANCA e ASCA na DII possui baixa sensibilidade, mas níveis elevados de especificidade como demonstrado em outros estudos publicados. A correlação dos anticorpos P-ANCA e ASCA com características clínicas ainda permanece controversa.

Descritores: 1.Doença de Crohn 2.Colite ulcerativa 3.Anticorpos anticitoplasma de neutrófilos 4.*Saccharomyces cerevisiae* 5.Marcadores biológicos

SUMMARY

Schappo F. *Evaluation of Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) and Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies (ASCA) in inflammatory bowel disease* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de medicina, Universidade de São Paulo”; 2007. 62p.

The determination of serologic markers P-ANCA (perinuclear antineutrophil cytoplasmic autoantibodies) and ASCA (anti-*Saccharomyces cerevisiae* mannan antibodies) assists as non-invasive way on the inflammatory bowel disease (IBD) diagnosis. The most associated pattern to ulcerative colitis (UC) occurs with ASCA- (negative) and P-ANCA + (positive). In the Crohn's disease (CD) is the opposite, that is, ASCA+ and P-ANCA-. Determination of P-ANCA is performed by an indirect immunofluorescence assay, using ethanol-fixed neutrophil slides and ASCA is measured by ELISA. Usually, the prevalence of P-ANCA in patients with UC has varied between 50 and 80% and in patients with CD between 10 and 30%. Healthy controls have disclosed lesser prevalence than 4% and pathological controls around 8%. Some studies had shown a wide variation in the results, suggesting both genetic and methodologic variations, according to the studied population. Serum samples were obtained from 200 patients for analysis of P-ANCA and ASCA, being 98 with UC and 102 with CD. The control group was represented by 54 healthy individuals. Patients with IBD were selected from the Department of Gastroenterology - Intestine Group of the Hospital das Clínicas of the University of São Paulo (HCFMUSP). P-ANCA prevalence found in UC, CD and control group were 61,2%, 16,7% e 5,6%, respectively, but ASCA prevalence in UC, CD and control group were 52,9%, 27,6% e 5,6%, respectively. Sensitivity and specificity achieved using ASCA+/P-ANCA- pattern for CD were 45,1% e 89,%, respectively, but P-ANCA+/ASCA- pattern for UC were 43,9% e 91,2% respectively. In this study, the current data did not support a relationship between the serological markers and clinical and demographic characteristics, except when evaluated the use of immunosuppressive drugs and infliximab in patients with CD and ASCA+, which were increased ($p=0,008$). Thus, the determination of antibodies P-ANCA and ASCA in the IBD gets low sensitivity, but high levels of especificity as demonstrated in other published reports. The correlation of antibodies P-ANCA and ASCA with clinical characteristics appears to be limited.

Descriptors: 1.Chron disease 2.Ulcerative colitis 3.Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody 4.*Saccharomyces cerevisiae* 5.Serological markers

INTRODUÇÃO

---

1 INTRODUÇÃO

A doença inflamatória intestinal (DII) engloba um amplo espectro de desordens que afetam o trato gastrointestinal. Pode possuir causa conhecida, tais como infecções, parasitoses, isquemia e irradiação, ou não totalmente esclarecida. Neste último grupo, cerca de 80 a 90% dos casos são diagnosticados como RCUI (Retocolite Ulcerativa Inespecífica) e DC (Doença de Crohn) e os demais, 10 a 20%, correspondem principalmente às colites linfocítica, colagenosa, eosinofílica e doença de Behçet. Entretanto, na prática, quando mencionamos DII, em geral nos referimos à RCUI e à DC, que representam as duas principais enfermidades do grupo de etiologia não totalmente esclarecida (1).

A RCUI é conhecida desde o século XIX e a DC foi primeiramente relatada pelo médico americano Burrill Crohn et al, em 1922, e inicialmente chamada de enterite regional (2).

A incidência (número de novos casos anuais por 100.000 habitantes) e a prevalência (número de casos por 100.000 habitantes) possuem ampla variação de acordo com a localização geográfica. A prevalência varia de 35 a 100 para RCUI e de 10 a 100 para a DC. A incidência pode variar de 0,5 a 13 para a RCUI e 0,08 a 7 para a DC (3).

No Brasil, ainda desconhecemos a real incidência da DII, sendo considerado um país de incidência baixa, bem como toda a América do Sul, ao contrário de países do norte da Europa e EUA. Em nosso meio, aparentemente, a incidência parece ser maior na região sul e sudeste e, como em outros locais do mundo, tem aumentado, especialmente por causa da elevação no número de pacientes com DC, o que pode

ser explicado tanto pelo melhor reconhecimento da doença quanto pela maior e mais contínua exposição a fatores ambientais ainda não claramente identificados (ex., xenobióticos) (3).

A DII acomete indivíduos de ambos os sexos, com o início dos sintomas principalmente entre a terceira e a quarta décadas de vida, porém, pode haver um segundo pico, com o início dos sintomas a partir dos 55 e 60 anos de idade (3).

A DII é mais comum entre os brancos do que entre os negros e asiáticos, apesar de notar-se incidência semelhante ou até maior entre os asiáticos ou latinos que se mudam para locais de alto risco para DII (norte da Europa e EUA) (3).

Também se percebe um maior acometimento das populações urbanas em comparação com as populações rurais, além de uma maior ocorrência entre indivíduos com nível socioeconômico mais elevado (3).

Apesar de compartilharem aspectos clínicos semelhantes, RCUI e DC são consideradas formas distintas de DII. A DC caracteriza-se por ocasionar um processo inflamatório crônico, transmural, granulomatoso, de aspecto salteado, que geralmente afeta a porção distal do íleo, podendo acometer o cólon ou qualquer parte do trato digestivo. A RCUI caracteriza-se por ocasionar uma inflamação crônica da mucosa e eventualmente da submucosa, contínua, limitada ao intestino grosso (1). Enquanto na RCUI a extensão do processo inflamatório habitualmente indica a gravidade da doença – quanto maior a extensão de cólon comprometida, maior a gravidade - e é considerado um dos principais parâmetros que podem influenciar o seu curso, na DC esta relação é mais complexa. Não somente a localização e a extensão estão implicadas, mas também o tipo ou forma da doença, como por exemplo, a presença de abscessos, fístulas, perfuração ou estenose, que, quando

presentes, constituem importantes aspectos relacionados com a evolução e tipo de abordagem terapêutica (4).

Dados evidenciam que cerca de 5 a 10% dos pacientes com DII não podem, com os métodos diagnósticos habituais (ex., quadro clínico, radiologia, endoscopia e anatomopatológico) ser classificados como RCUI ou DC e o diagnóstico final é designado “colite indeterminada”. O diagnóstico de colite indeterminada geralmente é temporário e muitos pacientes com colite indeterminada serão finalmente diagnosticados como RCUI ou DC ao longo do tempo, porém um grupo ainda se manterá indeterminado (5).

Apesar dos avanços no conhecimento da imunidade inata e adaptativa, a etiologia da DII ainda não está totalmente esclarecida (6,7). Sem dúvida, a etiopatogenia da DII é multifatorial envolvendo a interação de fatores genéticos, luminais (presentes no lume intestinal, como antígenos alimentares e bacterianos), ligados à barreira intestinal (ex., aumento da permeabilidade intestinal) e imunológicos (redução da atividade da imunidade inata e exacerbação da resposta adaptativa ou adquirida com conseqüente amplificação do processo inflamatório) (3). Todos esses aspectos, por sua vez, vão interagir com fatores ambientais (ex., tabagismo, consumo de antiinflamatórios não esteróides e de anticoncepcionais, etc), gerando, finalmente, a DII (6,7).

Vários trabalhos recentes (8,9) sugerem que a ativação imunológica na mucosa intestinal, em hospedeiros geneticamente susceptíveis, representa um papel crucial na patogênese da doença. Desta forma, a DII resultaria de uma resposta imune aberrante e perda de tolerância à microbiota intestinal normal, conduzindo à inflamação crônica do intestino.

Fatores genéticos possuem um significado importante na patogênese da DII (10). Sabe-se da sua associação com síndromes e doenças com substrato genético e da associação com o sistema HLA (“human leukocyte antigen”), principalmente em relação com a RCUI (11,12).

Pelo menos 10 a 15 genes podem estar implicados na susceptibilidade à DII, definindo um padrão complexo de herança (13,14). Estudos realizados em muitas regiões do genoma têm identificado prováveis genes que conferem susceptibilidade à DII. A região mais estudada, denominada IBD 1 (*locus* 1 da doença inflamatória intestinal), localiza-se no cromossomo 16q, onde, aliás, foram identificadas as mutações do gene NOD2/CARD15, que sugere uma variante genética altamente associada com DC em cerca de 15 - 30% dos casos (15,16).

Outro fato que ressalta a importância do envolvimento de fatores genéticos na etiopatogenia da DII é a ocorrência de história familiar de DII em 10 a 30% dos pacientes, particularmente em parentes de primeiro grau. De fato, a incidência de DII em parentes de primeiro grau de pacientes com DII é 30 a 100 vezes maior que a observada na população geral (17).

Várias formas de avaliação da atividade da RCUI e DC têm sido propostas. As mais comuns referem-se aos chamados índices de atividade. Sua determinação nos auxilia na adequação do tratamento e na avaliação da resposta terapêutica. Os índices de atividade, em geral, levam em consideração aspectos clínicos, laboratoriais e endoscópicos. Os mais utilizados têm sido o índice de Truelove & Witts (18) para a RCUI e o CDAI (“Crohn’s Disease Activity Index”) para a DC (19).

O diagnóstico da DII, bem como sua diferenciação entre DC e RCUI, pode ser feito com acurácia na maioria dos pacientes, com base na história clínica, exame

físico, dados laboratoriais, exames endoscópicos (ex., endoscopia digestiva alta, enteroscopia, cápsula endoscópica, colonoscopia etc), biópsias e exames radiológicos (ex., trânsito intestinal, ultrassonografia, tomografia computadorizada, ressonância nuclear magnética etc). (3)

A extensão do comprometimento inflamatório na RCUI é determinada pelo exame colonoscópico e pode ser classificada em pancolite (colite extensa ou universal), associada com maior gravidade e risco de malignidade, colite esquerda (acometendo o cólon esquerdo somente ou afetando também a região do transverso próxima do ângulo esplênico) e colite distal (proctite e proctossigmoidite). A DC, por sua vez, pode ser classificada em forma inflamatória (não estenosante, não penetrante), estenosante (associada a um comportamento mais indolente) e penetrante (associada a um comportamento mais agressivo pela ocorrência de fístulas e/ou abscessos) (3).

Hoje, sabe-se que na DII não existe somente heterogeneidade fenotípica, mas também importante heterogeneidade genética. Assim, determinados fatores, como a própria heterogeneidade, opções terapêuticas mais novas como anticorpos contra TNF- α e freqüentes formas de apresentações inespecíficas, requerem a necessidade de novas ferramentas diagnósticas, as quais devem ser obtidas por métodos em que se confirme alta sensibilidade (positivo na maioria dos pacientes que sofrem da doença), alta especificidade (presente somente naquela particular doença) e que sejam pouco invasivos. Neste contexto, inserem-se os marcadores sorológicos (20).

A busca por marcadores sorológicos para a DII ocorre há mais de 30 anos. Muitos marcadores sorológicos têm sido relatados nos últimos anos, sendo considerados úteis não somente para o diagnóstico e diferenciação entre RCUI e DC

(especialmente nos casos indeterminados), mas também no esclarecimento da etiopatogênese da DII, no auxílio do manejo da doença e na identificação de subgrupos específicos de DII com diferentes cursos evolutivos (4). Dentre estes marcadores sorológicos, os mais estudados têm sido o **P-ANCA** (anticorpo perinuclear contra estruturas citoplasmáticas do neutrófilo), o **ASCA** (anticorpo anti-*Saccharomyces cerevisiae*), o **anticorpo pancreático**, o **anticorpo IgA anti-Omp C** (“outer membrane porin from *E. coli*”), o **anticorpo I2** (anticorpo para *Pseudomonas. fluorescens* associado à sequência I2) e os **anticorpos contra bastonetes coccoides anaeróbios** (“antibodies to anaerobic coccoid rods”), sendo os dois primeiros (P-ANCA e ASCA) os mais conhecidos e amplamente pesquisados (2).

Na DII, o P-ANCA é encontrado principalmente na RCUI, enquanto que o ASCA é encontrado predominantemente na DC. O padrão de associação mais relacionado à RCUI ocorre com ASCA negativo e P-ANCA positivo. Na DC, ocorre o contrário, ou seja, ASCA positivo com P-ANCA negativo (21,22).

A avaliação combinada do P-ANCA e do ASCA possui alta especificidade, maior que 90% em muitos estudos na diferenciação entre RCUI e DC, o que geralmente não ocorre quando se faz a determinação separada do P-ANCA ou do ASCA. A sensibilidade nestas situações tende a ser menor variando entre 40 a 60% (21,22).

ANCA

ANCAs são auto-anticorpos dirigidos contra componentes intracelulares dos neutrófilos e monócitos (23,24). Foram primeiramente associados com as vasculites

de pequenos vasos, tais como a granulomatose de Wegner, a poliangeíte microscópica e a síndrome de Churg-Strauss (25), auxiliando no diagnóstico e monitoramento da atividade inflamatória (26). Também estão presentes em outras doenças inflamatórias como hepatite auto-imune, colangite esclerosante primária, artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico e na própria DII (26).

Os anticorpos contra estruturas intracelulares do neutrófilo (ANCA) são classicamente determinados por imunofluorescência indireta usando-se neutrófilos fixados em etanol, como estabelecido no Consenso Internacional sobre o ANCA (26). De acordo com a imunofluorescência indireta, três padrões clássicos de pontilhado intracelular podem se obtidos: citoplasmático, perinuclear e atípico (Apêndice 1)(31).

O padrão granular citoplasmático (**C-ANCA**) está primariamente presente no sangue de pacientes com granulomatose de Wegner e reconhece como antígeno principal a proteinase-3, observando-se fluorescência granular citoplasmática acentuada na região central interlobular (27).

O padrão granular perinuclear (**P-ANCA**) está presente principalmente nos pacientes com poliangeíte microscópica e a sua variante renal, reconhecendo como principal antígeno a mieloperoxidase. Neste padrão, observa-se fino pontilhado de forma homogênea no formato de um rim no citoplasma da região perinuclear, podendo ocorrer extensão para a região nuclear (28).

O padrão *atípico* (**P-ANCA atípico**) ocorre quando a forma perinuclear está presente, mas não reconhece a mieloperoxidase como antígeno. Verifica-se um pontilhado formando uma fina camada não homogênea no formato de um rim na periferia do próprio núcleo celular. É este o padrão que é encontrado na maioria dos

pacientes com RCUI, hepatites auto-imunes e colangite esclerosante primária e, em menor proporção, nos pacientes com DC (29). O padrão do P-ANCA encontrado na DII é o resultado de antígenos nucleares que são sensíveis à desoxiribonuclease (DNase), ou seja, que desaparecem após o tratamento com DNase (30). Esta reação parece não ocorrer nos padrões de P-ANCA encontrados em outras patologias, como é o caso da colangite esclerosante primária e hepatite auto-imune, em que os dados sugerem, reconhecem antígenos localizados no citoplasma e não no núcleo. Percebe-se que tal procedimento nem sempre é adotado pelos laboratórios.

Através do isolamento e purificação do P-ANCA de pacientes com RCUI, alguns antígenos alvos foram identificados. Vários estudos utilizando o método de ELISA foram realizados com o objetivo de se detectar os antígenos reconhecidos pelo P-ANCA atípico, alguns localizados no citoplasma e outros localizados no núcleo celular. Os mais reconhecidos foram **histona – H1** (pequena proteína intimamente envolvida no revestimento do DNA no núcleo das células), **HMG1 e HMG2** (grupo das proteínas cromossômicas não-histonas, de alta mobilidade), **proteína específica nuclear de 50-kilodalton (kDa)**, **proteínas envolvidas no reconhecimento do aumento da permeabilidade/bactericida**, **catepsina G**, **elastase**, **β -glucuronidase**, **lactoferrina**, **catalase** e **α -enolase** (localizadas no citoplasma dos neutrófilos) (31)

Alguns autores também têm sugerido que o P-ANCA encontrado nos pacientes com DII reaja com antígenos bacterianos potencialmente envolvidos na patogênese da DII (32,33).

Todos os tipos de P-ANCA, incluindo o atípico, possuem um aspecto padrão à imunofluorescência indireta sob a forma de artefato devido à fixação dos neutrófilos com álcool. Quando os neutrófilos são fixados com reagentes não alcoólicos, como,

por exemplo, a formalina, a reação perinuclear é abolida e convertida, nos casos com antígeno alvo citoplasmático, ao padrão de reação citoplasmática (28).

De forma geral, a prevalência do P-ANCA em pacientes com RCUI tem variado entre 50 e 80% e em pacientes com DC entre 10 e 30% (34,35,20). Controles sadios têm revelado prevalência menor que 4% (20,22) e controles patológicos (diarréias infecciosas, doença celíaca, dermatite herpetiforme, etc) em torno de 8% (20,22,36). Alguns trabalhos mostraram ampla variação nos resultados, sugerindo além de variação metodológica, variações genéticas de acordo com a população estudada (37,38)

No Brasil, foram realizados poucos estudos com o objetivo de se determinar a prevalência dos anticorpos ANCA e ASCA na doença inflamatória intestinal, observando-se também, utilização de número limitado de pacientes (39,40).

Alguns autores têm relacionado a positividade do P-ANCA na RCUI com doença mais grave, mais resistente ao tratamento, mais propensa ao tratamento cirúrgico precoce, maior risco de “bolsite” naqueles submetidos à anastomose ileoanal (*pouch* ileal) e possuindo marcadores HLA específicos (41,42). Porém, outros autores, falharam em demonstrar tais associações (20).

Um subgrupo especial de pacientes com DC apresenta P-ANCA positivo. São pacientes com comprometimento colônico com características clínicas semelhantes às de RCUI (retocolite símile), idade de início da doença mais tardia, menor incidência de formas penetrantes e fibroestenóticas e menor índice de resposta às drogas que agem contra o fator de necrose tumoral (anti-TNF) (43,44).

ASCA

O *Saccharomyces cerevisiae* é a espécie mais comum do gênero *Saccharomyces*. É usado no fermento do padeiro e dos fabricantes de cerveja. O anticorpo contra o *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) tem sido apontado como marcador sorológico da DC e foram descritos pela primeira vez, nestes pacientes, em 1988 (45,46)

Ambos anticorpos IgG e IgA são formados. Estas imunoglobulinas reconhecem epitopos de carboidratos, mais precisamente seqüências de manose, que fazem parte de uma glicoproteína de 200-kDA, a fosfopeptidomanan, presente na parede celular do *Saccharomyces cerevisiae*, principalmente nas cepas Su1 (47,48). Ao contrário do que se observa com o P-ANCA, o ASCA não parece reagir como um auto-anticorpo. Trata-se de um anticorpo contra antígeno(s) do próprio *Saccharomyces cerevisiae*. Alternativamente, poderia corresponder a uma resposta a um antígeno ainda não identificado (de fungos ou de bactérias) que promoveria reação cruzada com o *Saccharomyces cerevisiae* (31).

Um estudo realizado com o objetivo de investigar a correlação entre a sua detecção no sangue com a presença do DNA do *S. cerevisiae* na mucosa intestinal, em pacientes com DC e RCUI, não encontrou associação, sugerindo que a presença do ASCA não seja decorrente da exposição contínua ao *S. cerevisiae* na mucosa e que ela provavelmente ocorre precocemente na vida do indivíduo, com seus níveis permanecendo estáveis (74). Neste trabalho também foi postulada a hipótese de que o ASCA presente nos pacientes com DII, reflita, além de um epifenômeno, uma reação a outro antígeno ainda não reconhecido.

O ASCA possui alta especificidade para DC, pois está raramente presente em pessoas que não possuem DII (49). As estatísticas variam em relação à frequência do ASCA, mostrando números que variam entre 50 e 70% na DC, 6 e 14% na RCUI e 0 e 5% nos grupos controles (50).

O ASCA é determinado por método de ELISA. Vários “kits” comerciais estão disponíveis no mercado tornando o acesso ao exame relativamente fácil. Entretanto, pode ser percebida variações dos resultados entre os “kits” empregados de diferentes laboratórios, podendo refletir variações dependentes da metodologia empregada (51).

A avaliação do ASCA em familiares assintomáticos de pacientes com DC tem sugerido que o ASCA talvez possa representar um novo marcador específico de susceptibilidade genética para a doença (52). O ASCA tem sido detectado em cerca de 20 a 25% dos parentes de primeiro grau de pacientes com DC, mas se estes anticorpos correspondem a marcadores de uma doença futura, isso ainda não foi convincentemente comprovado (53).

É possível que a presença do ASCA associe-se à heterogeneidade clínica da DC e possa ser empregado na prática clínica como um marcador prognóstico. Estudos preliminares em pacientes com DC têm encontrado relação entre presença do ASCA e início mais precoce da doença, envolvimento ileal, padrão estenosante e necessidade precoce de cirurgia, porém tais resultados não foram devidamente confirmados (44).

No presente trabalho, com a utilização de uma casuística mais abrangente, pesquisamos a prevalência e a acurácia dos anticorpos P-ANCA e ASCA e suas possíveis correlações com características clínicas em um grupo de pacientes com RCUI e DC.

OBJETIVOS

Objetivos

- 2.1 Pesquisar os marcadores sorológicos P-ANCA e ASCA em pacientes com RCUI, DC e indivíduos sadios, para determinação da prevalência, sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo.
- 2.2 Correlacionar os resultados obtidos com a determinação dos anticorpos P-ANCA e ASCA na DII, com aspectos clínicos e demográficos.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

---

3 Casuística e Métodos

Foram realizadas análises no soro de 200 pacientes para pesquisa de P-ANCA e ASCA, sendo 98 com RCUI e 102 com DC. O grupo controle foi representado por 54 indivíduos sadios. Os pacientes com DII foram oriundos do ambulatório de Gastroenterologia – Grupo de Intestino do Hospital das Clínicas Faculdade da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). Os soros foram colhidos no laboratório do Instituto Central da FMUSP mediante consentimento por escrito assinado pelo paciente autorizando o procedimento. Após coleta do sangue, o soro foi encaminhado ao laboratório de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM 017), onde foi executada a análise dos marcadores. O mesmo procedimento de consentimento escrito foi adotado para o grupo controle.

Os pacientes com DII tiveram seu diagnóstico bem estabelecido tanto de RCUI quanto de DC, de acordo com critérios clínicos, endoscópicos, radiológicos e histológicos. Não fizeram parte do estudo pacientes com colite indeterminada e pacientes menores que 16 anos.

Através da revisão de prontuários e aplicação de questionário, foi realizada avaliação clínica de 94 pacientes com DC e 86 com RCUI, somando 180 pacientes do total de 200 pacientes estudados. Foram analisados aspectos relativos ao sexo, idade, cor, localização da doença (proctite, proctossigmoidite, colite esquerda, pancolite, envolvimento do intestino delgado), apresentação (inflamatória, estenosante, penetrante), história de cirurgia prévia, manifestações extra-intestinais, atividade da doença (ativa ou em remissão) e uso de medicações imunossupressoras,

elementos estes avaliados no período em que foram dosados os marcadores estudados.

Em relação à cor, os pacientes foram agrupados em dois grupos, denominados brancos e não brancos. No grupo de não brancos foram incluídos indivíduos negros, de origem asiática e indígena.

A apresentação da doença, se refere ao comportamento da mesma, no caso da doença de Crohn, em que o termo estenosante foi usado pra designar pacientes que possuíam ou tiveram ao longo da história da sua doença estenoses ou sub-estenoses no trato gastrintestinal, enquanto que o termo penetrante se refere àqueles que possuíam ou possuíram fistulas entéricas ou de canal anal. O termo inflamatório foi designado aos pacientes que possuíam somente inflamação e nunca possuíram áreas de estenoses ou fístulas ao longo do trato gastrintestinal.

As manifestações extra-intestinais foram consideradas aquelas que podem ocorrer associadamente com a doença inflamatória intestinal. As doenças ou manifestações investigadas foram artralgia e, ou, artrite, sacroileíte, espondilite anquilosante, colangite esclerosante primária (CEP), manifestações oculares (irite e uveíte) e manifestações dermatologias (eritema nodoso e pioderma gangrenoso).

No que diz respeito à história de cirurgia prévia, foram considerados aqueles que já haviam sido submetidos às intervenções cirúrgicas anteriores de enterectomias ou colectomias parciais ou totais.

Para designar o grau de atividade, foi utilizado o índice Truelove & Witts(18) que classifica a doença em leve, moderada ou severa para a RCUI e o CDAI (“Crohn’s Disease Activity Index”) (19) que classifica a doença em fase de remissão, leve, moderada ou severa para DC.

Em relação ao uso de drogas imunossupressoras, além destas, representadas na sua grande maioria pela azatioprina, também foi verificado o uso pelo paciente de infliximab, isoladamente, ou em associação com drogas imunossupressoras.

O estudo foi iniciado após a aprovação da Comissão de Ética do HCFMUSP.

DETECÇÃO DE ANCA: A pesquisa de ANCA nos soros foi feita pela técnica de imunofluorescência indireta utilizando-se neutrófilos humanos fixados em etanol como substrato. Para tanto, as células foram isoladas do sangue de indivíduos saudáveis através de gradiente de Ficoll-Hypaque ($d=1,077$). As células isoladas foram lavadas duas vezes com solução salina tamponada (PBS pH 7,2) a 400g por 10 minutos, e ressuspendidas para $5 \times 10^5/\text{ml}$ em meio de cultura RPMI (Gibco BRL) contendo 10% de soro fetal bovino (Cultilab). As lâminas foram preparadas por citocentrifugação (600g/1 min) e, após a secagem à temperatura ambiente, as células foram fixadas com etanol 4°C por 10 min e estocadas a -20° C até o uso. Os soros foram testados na diluição de 1:20 em PBS por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas por 30 min com anticorpo anti-IgG humana conjugado à fluoresceína produzido em cabras (IMMCO Diagnostics, EUA). As lâminas foram analisadas pelo menos por dois pesquisadores em microscópio de imunofluorescência com epiluminação (Nikon, Japão). Em cada teste foram incluídos soros positivos e negativos para IgG-ANCA como referência.

Foram considerados positivos somente os soros de pacientes com padrão perinuclear (P-ANCA).

DETECÇÃO DE ASCA: A detecção de anticorpos IgG e IgA anti-*Saccharomyces cerevisiae* foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA) empregando kits comerciais (INOVA Diagnostics, Incorp.) que utilizam antígeno parcialmente purificado de *S. cerevisiae* (INOVA DIAGNOSTICS, Inc. San Diego, CA USA.). Os ensaios foram realizados seguindo-se sistematicamente o protocolo estabelecido pelo fabricante. Em cada ensaio, foram incluídos como referência três soros todos fornecidos pelo fabricante: um com reatividade alta, outro com baixa reatividade (25U) e um outro negativo. Os resultados foram expressos em unidades de densidade ótica DO (U_{DO}) e calculados pela fórmula:

$$U_{DO} = DO_{\text{amostra teste}} / DO_{\text{soro baixa reatividade}} \times 25.$$

Os ensaios foram realizados por um mesmo pesquisador de modo cego em relação aos dados clínicos dos pacientes.

Os resultado foi expresso como sendo positivo ($ASCA \geq 25$ unidades) ou negativo ($ASCA < 25$ unidades).

DESCRIÇÃO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram calculadas as prevalências de pesquisa positiva para P-ANCA, ASCA IgA e ASCA IgG em uma amostra de conveniência de pacientes com diagnóstico de DII (doença de Crohn e retocolite ulcerativa inespecífica) e de controles sem DII. O intervalo de confiança produz a ampliação de um simples valor estimado (por exemplo, a prevalência) para um conjunto de valores que são considerados plausíveis para a população e é uma maneira de mostrar a imprecisão de uma determinada estatística, devido ao grau de variabilidade da característica que está sendo estudada e do tamanho limitado do estudo (54). O nível de confiança usualmente adotado é 95%, o que significa que há 95% de chance de que o intervalo indicado inclua o valor do coeficiente de correlação para a “população” (ou seja, o valor que seria obtido se todas as pessoas que preenchessem os critérios de inclusão no estudo). Em termos estatísticos, o intervalo de confiança significa que se uma série de estudos idênticos fosse conduzida repetidamente com diferentes amostras da mesma população, e um intervalo de 95% de confiança para o coeficiente de correlação fosse calculado em cada estudo, então ao final dos estudos, 95% destes intervalos de confiança incluiriam o coeficiente de correlação da população (54,55).

Para comparar as características clínicas e sorológicas dos pacientes com DC e RCUI foram incluídos quase que toda a totalidade dos pacientes incluídos no estudo sobre a pesquisa dos marcadores sorológicos, deixando-se aleatoriamente 20 pacientes, os quais não se conseguiram aplicar o questionário nem levantar o prontuário na ocasião. Para as características dos pacientes apresentadas como variáveis categóricas foram calculadas as frequências de cada categoria; para as

características expressas como variáveis quantitativas foram calculados a média e o desvio padrão.

Para a comparação da distribuição de frequências das variáveis categóricas foi utilizado o teste de qui-quadrado de Pearson, o teste exato de Fisher ou o teste da razão de verossimilhança. Para a comparação da distribuição de variáveis quantitativas foi utilizado o teste t de Student (56). A análise da associação entre início precoce da DC, pesquisa de ASCA e apresentação agressiva da doença (história de cirurgia prévia e/ou de fibroestenose ou penetração) foi feita usando-se estratificação e o teste de qui-quadrado de Mantel-Haenszel (57). Admitiu-se nível de significância $p < 0,05$.

A análise estatística foi realizada com o uso do software STATA™ (Statistics/Data Analysis), versão 9.0. Os gráficos foram construídos com uso do software Microsoft Excel™, versão 97.

RESULTADOS

---

4 Resultados

Foram incluídos no estudo 254 sujeitos, dos quais 98 tinham diagnóstico de retocolite ulcerativa inespecífica (RCUI), 102 tinham diagnóstico de doença de Crohn (DC) e 54 não apresentavam doenças inflamatórias intestinas ou outras doenças inflamatórias ou autoimunes. Os diagnósticos de DC e RCUI foram realizados mediante endoscopia e/ou RX contrastado de abdômen e exame histológico.

1. Prevalência de pesquisa positiva para P-ANCA

Dentre os 254 sujeitos analisados, 77 apresentaram pesquisa positiva para P-ANCA, o que representa uma prevalência de 30,3% (IC_{95%}: 24,7% a 36,4%). Dentre os pacientes com RCUI, 60 (61,2%; IC_{95%}: 50,8% a 70,9%) apresentaram pesquisa positiva para P-ANCA, enquanto que 17 (16,7%; IC_{95%}: 10,0% a 25,3%) pacientes com DC apresentaram este achado ($p < 0,001$). Nenhum sujeito sem doença inflamatória intestinal apresentou pesquisa positiva para ANCA.

2. Prevalência de pesquisa positiva para ASCA - IgA

Cinquenta e cinco (21,6%; IC_{95%}: 16,7% a 27,2%) sujeitos investigados apresentaram resultado positivo para pesquisa de ASCA – IgA e 12 (4,7%; IC_{95%}: 2,5% a 8,1%) apresentaram resultado suspeito.

A prevalência de pesquisa de ASCA - IgA positiva foi significativamente mais elevada entre os pacientes com DC que entre aqueles com RCUI e os controles ($p < 0,001$): entre os pacientes com RCUI, 18 (18,4%; IC_{95%}: 11,3% a 27,5%) apresentaram resultado positivo; Por outro lado, entre os pacientes com DC, 36 (35,3%; IC_{95%}: 26,1% a 45,4%) apresentaram resultado positivo. Entre os 54 sujeitos sem doença inflamatória intestinal, um (1,9%; IC_{95%}: 0,05% a 9,9%) apresentou resultado positivo para pesquisa de ASCA - IgA.

3. Prevalência de pesquisa positiva para ASCA - IgG

A prevalência de pesquisa de ASCA - IgG positiva também foi significativamente mais elevada entre os pacientes com DC que entre aqueles com RCUI e os controles ($p < 0,001$): Entre os pacientes com DC, 46 (45,1%; IC_{95%}: 35,2% a 55,3%) apresentaram resultado positivo para a pesquisa de ASCA – IgG , ao passo que entre os pacientes com RCUI, 17 (17,4%; IC_{95%}: 10,4% a 26,3%) apresentaram resultado positivo. Finalmente, entre os sujeitos sem doença inflamatória intestinal, três (5,6%; IC_{95%}: 1,2% a 15,4%) apresentaram resultado positivo para a pesquisa de ASCA – IgG.

4. Pesquisa de ASCA – combinação de IgA e IgG

Oitenta e quatro (33,1%; IC_{95%}: 27,3% a 39,2%) sujeitos estudados apresentaram resultado positivo para a pesquisa de ASCA.

A prevalência de pesquisa de ASCA positiva foi significativamente mais elevada entre os pacientes com DC que entre aqueles com RCUI e os controles ($p < 0,001$): dos 102 pacientes com DC investigados, 54 (52,9%; IC_{95%}: 42,8% a 62,9%) apresentaram resultado positivo para a pesquisa de ASCA. Por outro lado, dos 98 pacientes com RCUI investigados, 27 (27,6%; IC_{95%}: 19,0% a 37,5%) apresentaram resultado positivo para a pesquisa de ASCA. Entre os 54 sujeitos sem doença inflamatória intestinal, três (5,6%; IC_{95%}: 1,2% a 15,4%) apresentaram resultado positivo para a pesquisa de ASCA.

Os resultados da prevalência de pesquisa positiva de P-ANCA e ASCA estão sintetizados no figura 1.

Figura 1. Prevalência dos marcadores sorológicos P-ANCA e ASCA na população estudada (n = 254)

5. Medidas de desempenho das pesquisas de P-ANCA e ASCA para distinguir os pacientes com doença inflamatória intestinal (RCUI + DC) dos sujeitos sem doença inflamatória intestinal

As medidas de desempenho das pesquisas de P-ANCA e ASCA isoladas e combinadas são apresentadas na tabela 1. A especificidade dos testes isolados e combinados foi superior a 90%. Por outro lado, a sensibilidade dos testes foi baixa (maior para a pesquisa de ASCA isolada, mas ainda assim inferior a 50%). O VPP dos testes foi elevado (superior a 90% em todas as situações); todavia, o VPN foi baixo em todas as situações (valor mais elevado para a pesquisa de P-ANCA isolada, 30,5%).

Tabela 1. Medidas de desempenho (e respectivos intervalos de confiança) das pesquisas de P-ANCA e ASCA para distinguir pacientes com doença inflamatória intestinal (n = 200) dos sujeitos sem doença inflamatória intestinal (n = 54)

	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
P-ANCA +	38,5% (77/200)	100,0% (54/54)	100,0% (77/77)	30,5% (54/177)
IC_{95%}	(31,7% a 45,6%)	(93,4% a 100,0%)	(95,3% a 100,0%)	(23,8% a 37,9%)
ASCA +	40,5% (81/200)	94,4% (51/54)	96,4% (81/84)	30,0 (51/170)
IC_{95%}	(33,6% a 47,7%)	(84,6% a 98,8%)	(89,9% a 99,3%)	(23,2% a 37,5%)
ASCA+/P-ANCA-	28,0% (56/200)	94,4% (51/54)	94,9% (56/59)	26,2% (51/195)
IC_{95%}	(21,9% a 34,8%)	(84,6% a 98,8%)	(85,9% a 98,9%)	(20,1% a 32,9%)
P-ANCA+/ASCA-	26,0% (52/200)	100,0% (54/54)	100,0% (52/52)	26,7% (54/202)
IC_{95%}	(20,1% a 29,5%)	(93,4% a 100,0%)	(93,2% a 100,0%)	(20,8% a 33,4%)

6. Medidas de desempenho das pesquisas de P-ANCA e ASCA para distinguir os pacientes com doença de Crohn daqueles com retocolite ulcerativa inespecífica

Tabela 2. Medidas de desempenho (e respectivos intervalos de confiança) das pesquisas de P-ANCA e ASCA para distinguir pacientes com doença de Crohn (n = 102) daqueles com retocolite ulcerativa inespecífica (n = 98)

	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
DC				
ASCA +	52,9% (54/102)	72,4% (71/98)	66,7% (54/81)	59,7 (71/119)
IC_{95%}	(42,8% a 62,9%)	(62,5% a 81,0%)	(55,3% a 76,8%)	(50,3% a 68,6%)
ASCA+/P-ANCA-	45,1% (46/102)	89,8% (88/98)	82,1% (46/56)	61,1% (88/144)
IC_{95%}	(35,2% a 55,3%)	(82,0% a 95,0%)	(69,6% a 91,1%)	(52,6% a 69,1%)
RCUI				
P-ANCA +	61,2% (60/98)	83,3% (85/102)	77,9% (60/77)	69,1% (85/123)
IC_{95%}	(50,9% a 70,9%)	(74,7% a 90,0%)	(67,0% a 86,6%)	(60,1% a 77,1%)
P-ANCA+/ASCA-	43,9% (43/98)	91,2% (93/102)	82,7% (43/52)	62,8% (93/148)
IC_{95%}	(33,9% a 54,3%)	(83,9% a 95,9%)	(69,7% a 91,8%)	(54,5% a 70,6%)

7. Análise das características demográficas, clínicas e sorológicas

Para o estudo das características demográficas, clínicas e sorológicas foram avaliados 86 pacientes com RCUI e 94 pacientes com DC, somando 180 pacientes do total de 200 pacientes estudados.

Tabela 3. Características sócio-demográficas, clínicas e sorológicas dos pacientes com doença inflamatória intestinal (n = 180)

Variável	DOENÇA	
	DC (n=94) n(%)	RCUI (n=86) n(%)
Sexo		
Feminino	56 (59,57)	53 (61,63)
Masculino	38 (40,43)	33 (38,37)
Cor		
Branco	73 (77,66)	65 (75,58)
Não branco	21 (22,34)	21 (24,42)
Gravidade		
Remissão	61 (64,89)	-
Leve	22 (23,4)	72 (83,72)
Moderado	9 (9,57)	14 (16,28)
Grave	2 (2,13)	0 (0)
Cirurgia		
Não	54 (57,45)	83 (96,51)
Sim	40 (42,55)	3 (3,49)
Manifestações extra-intestinais		
Não	62 (65,96)	55 (63,95)
Sim	32 (34,04)	31 (36,05)
Pioderma gangrenoso	0 (0)	1 (1,16)
Uveíte	2 (2,13)	1 (1,16)
Sacroileíte	4 (4,26)	3 (3,49)
CEP	0 (0)	4 (4,65)
Eritema nodoso	1 (1,06)	1 (1,16)
Artralgia / artrite	24 (25,53)	25 (29,07)
Imunossupressores		
Não	30 (31,91)	69 (80,23)
Infliximab	3 (3,19)	0 (0)
Azatr	51 (54,26)	17 (19,77)
Infliximab + Aza	10 (10,64)	0 (0)
ASCA		
-	44 (46,81)	64 (74,42)
+	50 (53,19)	22 (25,58)
P-ANCA		
-	76 (80,85)	32 (37,21)
+	18 (19,15)	54 (62,79)

Tabela 4. Localização e apresentação das lesões dos pacientes com doença inflamatória intestinal (n = 180)

Grupo / Variável	n	%
RCUI		
Localização		
Pancolite	43	50,00
Proctosigmoidite	18	20,93
Colite esquerda	19	22,09
Proctite	6	6,98
DC		
Localização		
Intestino delgado e cólon	41	43,62
Intestino delgado	31	32,98
Cólon	18	19,15
Cólon e reto	2	2,13
Reto	2	2,13
Apresentação		
Inflamatório	30	31,91
Penetrante	23	24,47
Estenose	21	22,34
Estenosante e penetrante	20	21,28

Figura 2 . Distribuição dos pacientes segundo apresentação e localização da doença

Figura 3 . Distribuição dos pacientes segundo gravidade e doença

Observa-se que os grupos são distribuídos diferentemente em relação à gravidade da doença (p=0,001).

Figura 4 . Distribuição dos pacientes segundo cirurgia e doença

O grupo DC apresenta maior proporção de cirurgia do que o grupo RCUI.

Figura 5. Distribuição dos pacientes segundo utilização de imunossupressores e doença

O grupo DC tem proporção maior de utilização de imunossupressores.

Tabela 5. Média e desvio padrão de idade, idade de início dos sintomas e idade na época do diagnóstico dos pacientes com doença inflamatória intestinal (n=180)

Variável	DOENÇA		p*
	DC (n=94)	RCUI (n=86)	
Idade (anos)	41,45 ± 14,14	40,95 ± 11,41	0,798
Idade de início (anos)	31,30 ± 13,54	32,46 ± 10,72	0,529
Idade ao diagnóstico (anos)	32,76 ± 13,16	33,77 ± 10,36	0,570

* teste t-Student

Não se observou diferença estatística entre os grupos DC e RCIU em relação à idade, idade de início da doença e idade de diagnóstico.

Tabela 6A. Relação entre características sócio-demográficas, clínicas e sorológicas dos pacientes com RCUI e P-ANCA.

Variável	P-ANCA		p	teste
	- (n=32) n (%)	+ (n=54) n (%)		
Sexo				
Feminino	21 (39,62)	32 (60,38)	0,557	*
Masculino	11 (33,33)	22 (66,67)		
Cor				
Branco	25 (38,46)	40 (61,54)	0,673	***
Não branco	7 (33,33)	14 (66,67)		
Gravidade				
Leve	28 (38,89)	44 (61,11)	0,465	*
Moderado	4 (28,57)	10 (71,43)		
Localização				
colite esquerda	8 (42,11)	11 (57,89)	0,794	**
pancolite	14 (32,56)	29 (67,44)		
proctite	2 (33,33)	4 (66,67)		
proctosigmoidite	8 (44,44)	10 (55,56)		
Cirurgia				
Não	31 (37,35)	52 (62,65)	1,000	***
Sim	1 (33,33)	2 (66,67)		
Manifestações extra-intestinais				
Não	22 (40)	33 (60)	0,476	*
Sim	10 (32,26)	21 (67,74)		
Pioderma gangrenoso	1 (100)	0 (0)		
Uveíte	0 (0)	1 (100)		
Sacroileíte	1 (33,33)	2 (66,67)		
CEP	0 (0)	4 (100)		
Eritema nodoso	1 (100)	0 (0)		
Artralgia / artrite	9 (36)	16 (64)		
Imunossupressores				
Não	25 (36,23)	44 (63,77)	0,706	*
Azatioprina	7 (41,18)	10 (58,82)		
Idade (anos)	39,25 + 10,91	41,96 + 11,68	0,289	****
Idade início (anos)	31,28 + 10,87	33,17 + 10,67	0,435	****
Idade diagnóstico (anos)	32,53 + 10,49	34,5 + 10,31	0,398	****

* teste qui-quadrado

** teste da razão de verossimilhança

*** teste exato de Fisher

**** teste t-Student

Não foram observadas associações entre nenhuma das características clínicas estudadas na RCUI e a presença do P-ANCA+.

Tabela 6B. Relação entre características sócio-demográficas, clínicas e sorológicas dos pacientes com RCUI e ASCA.

Variável	ASCA		p	teste
	- (n=64) n (%)	+ (n=22) n (%)		
Sexo				
Feminino	40 (75,47)	13 (24,53)	0,777	*
Masculino	24 (72,73)	9 (27,27)		
Cor				
Branco	49 (75,38)	16 (24,62)	0,718	*
Não branco	15 (71,43)	6 (28,57)		
Gravidade				
Leve	51 (70,83)	21 (29,17)	0,104	***
Moderado	13 (92,86)	1 (7,14)		
Localização				
colite esquerda	15 (78,95)	4 (21,05)	0,220	**
Pancolite	31 (72,09)	12 (27,91)		
Proctite	6 (100)	0 (0)		
proctosigmoidite	12 (66,67)	6 (33,33)		
Cirurgia				
Não	64 (77,11)	19 (22,89)	0,015	***
Sim	0 (0)	3 (100)		
Manifestações extra-intestinais				
Não	43 (78,18)	12 (21,82)	0,287	*
Sim	21 (67,74)	10 (32,26)		
Pioderma gangrenoso	1 (100)	0 (0)		
Uveíte	1 (100)	0 (0)		
Sacroileíte	3 (100)	0 (0)		
Eritema nodoso	1 (100)	0 (0)		
Artralgia / artrite	16 (64)	9 (36)		
Imunossupressores				
Não	53 (76,81)	16 (23,19)	0,356	***
Azatioprina	11 (64,71)	6 (35,29)		
Infliximab				
Azatioprina + Infliximab				
Idade (anos)	40,89 + 11,39	41,14 + 11,72	0,931	****
Idade início (anos)	32,03 + 11,01	33,76 + 9,94	0,524	****
Idade diagnóstico (anos)	33,5 + 10,56	34,55 + 9,97	0,686	****

* teste qui-quadrado

** teste da razão de verossimilhança

*** teste exato de Fisher

**** teste t-Student

Não foram observadas associações entre as características clínicas avaliadas na RCUI e a presença do ASCA +.

Tabela 7A. Relação entre características sócio-demográficas, clínicas e sorológicas dos pacientes com DC e ASCA.

Variável	ASCA		p	teste
	- (n=44) n (%)	+ (n=50) n (%)		
Sexo				
Feminino	27 (48,21)	29 (51,79)	0,740	*
Masculino	17 (44,74)	21 (55,26)		
Cor				
Branco	35 (47,95)	38 (52,05)	0,680	*
Não branco	9 (42,86)	12 (57,14)		
Gravidade				
Remissão	31 (50,82)	30 (49,18)	0,307	**
Leve	10 (45,45)	12 (54,55)		
Moderado	3 (33,33)	6 (66,67)		
Grave	0 (0)	2 (100)		
Local				
côlon	5 (27,78)	13 (72,22)	0,112	**
côlon + int. delgado	23 (56,1)	18 (43,9)		
côlon e reto	1 (50)	1 (50)		
intestino delgado	13 (41,94)	18 (58,06)		
reto	2 (100)	0 (0)		
Apresentação				
estenose	12 (57,14)	9 (42,86)	0,699	*
Estenose e penetrante	8 (40)	12 (60)		
inflamatório	13 (43,33)	17 (56,67)		
penetrante	11 (47,83)	12 (52,17)		
Cirurgia				
Não	22 (40,74)	32 (59,26)	0,171	*
Sim	22 (55)	18 (45)		
Manifestações extra-intestinais				
Não	31 (50)	31 (50)	0,388	*
Sim	13 (40,63)	19 (59,38)		
Pioderma gangrenoso	0 (0)	2 (100)		
Uveíte	0 (0)	2 (100)		
Sacroileíte	2 (50)	2 (50)		
Eritema nodoso	0 (0)	1 (100)		
Artralgia / artrite	11 (45,83)	13 (54,17)		
Imunossupressores				
Não	20 (66,67)	10 (33,33)	0,008	*
Sim	24 (37,50)	40 (62,50)		
Azatioprina	20 (39,22)	31 (60,78)		
Infliximab	1 (33,33)	2 (66,67)		
Azatioprina + Infliximab	3 (30)	7 (70)		
Idade (anos)	42,14 + 12,57	40,84 + 15,48	0,660	****
Idade início (anos)	32,2 + 13,15	30,5 + 13,96	0,545	****
Idade diagnóstico (anos)	33,66 + 11,99	31,96 + 14,18	0,535	****

* teste qui-quadrado

** teste da razão de verossimilhança

*** teste exato de Fisher

**** teste t-Student

Foi observada associação entre o uso de drogas imunossupressoras e a presença de ASCA+ nos pacientes com DC ($p=0,008$), porém não foram observadas associações com as demais características clínicas avaliadas, inclusive localização e apresentação da doença.

Tabela 7B. Relação entre características sócio-demográficas, clínicas e sorológicas dos pacientes com DC e P-ANCA.

Variável	P-ANCA		p	teste
	- (n=76) n (%)	+ (n=18) n (%)		
Sexo				
Feminino	45 (80,36)	11 (19,64)	0,883	*
Masculino	31 (81,58)	7 (18,42)		
Cor				
Branco	62 (84,93)	11 (15,07)	0,111	***
Não branco	14 (66,67)	7 (33,33)		
Gravidade				
Remissão	48 (78,69)	13 (21,31)	0,670	**
Leve	19 (86,36)	3 (13,64)		
Moderado	7 (77,78)	2 (22,22)		
Grave	2 (100)	0 (0)		
Local				
cólon	15 (83,33)	3 (16,67)	0,177	**
cólon + int. delgado	29 (70,73)	12 (29,27)		
cólon e reto	2 (100)	0 (0)		
Int. delgado	28 (90,32)	3 (9,68)		
reto	2 (100)	0 (0)		
Apresentação				
estenose	17 (80,95)	4 (19,05)	0,397	**
Estenose e penetrante	16 (80)	4 (20)		
inflamatório	22 (73,33)	8 (26,67)		
penetrante	21 (91,3)	2 (8,7)		
Cirurgia				
Não	42 (77,78)	12 (22,22)	0,379	*
Sim	34 (85)	6 (15)		
Manifestações extra-intestinais				
Não	52 (83,87)	10 (16,13)	0,300	*
Sim	24 (75)	8 (25)		
Pioderma gangrenoso	1 (50)	1 (50)		
Uveíte	1 (50)	1 (50)		
Sacroileíte	4 (100)	0 (0)		
Eritema nodoso	1 (100)	0 (0)		
Artralgia / artrite	17 (70,83)	7 (29,17)		
Imunossupressores				
Não	25 (83,33)	5 (16,67)	0,750	**
Azatioprina	42 (82,35)	9 (17,65)		
Infliximab	2 (66,67)	1 (33,33)		
Azatioprina + Infliximab	7 (70)	3 (30)		
Idade (anos)	41,41 + 14,02	41,61 + 15,02	0,957	****
Idade início (anos)	30,7 + 13,2	33,83 + 15,04	0,380	****
Idade diagnóstico (anos)	32,38 + 12,72	34,33 + 15,16	0,574	****

* teste qui-quadrado

** teste da razão de verossimilhança

*** teste exato de Fisher

**** teste t-Student

Não foram observadas associações entre as características clínicas estudadas nos pacientes com DC e a presença de P-ANCA+.

Figura 6. Distribuição dos pacientes com DC e uso de drogas imunossupressoras em relação à presença do ASCA+

DISCUSSÃO

---

5 Discussão

As prevalências verificadas na população estudada, em relação à presença dos anticorpos P-ANCA e ASCA nos pacientes com RCUI, DC e grupos controles, com exceção do resultado apresentado na dosagem do ASCA na RCUI, foram semelhantes às aquelas encontradas em diversos outros estudos. Na Tabela 8 estão representados alguns dos principais e mais recentes estudos realizados demonstrando a prevalência dos anticorpos na DII e grupos controles. Nestes trabalhos, podemos notar que foram utilizados, controles sadios, como no nosso caso e/ou controles patológicos, em geral representados por pacientes com doença celíaca ou colagenoses. O número de pacientes estudados, com exceção do trabalho de Peeters et al (20), oscilou entre 20 e 150. No presente trabalho, em que foram estudados 98 pacientes com RCUI e 102 pacientes com DC, podemos então perceber que se trata de uma amostragem de amplitude compatível com a que vem sendo apresentada pelos diversos grupos que abordam este tema.

Quando aprofundamos a pesquisa na literatura referente à prevalência desses marcadores na DII, verificamos que a positividade do P-ANCA variou de 23 a 89% na RCUI e de 5 a 38% na DC. Por sua vez, a positividade do ASCA variou de 35 a 80% na DC e de 0 a 27% na RCUI (3).

As amplas variações relatadas nas frequências dos anticorpos analisados em pacientes com DII podem refletir diferenças metodológicas empregadas na determinação dos anticorpos ou diferenças raciais de acordo com a população estudada (31).

A maioria dos dados obtidos é proveniente de populações europeias ou da América do Norte. Poucos são os relatos referentes a outras partes do mundo. Um estudo realizado na Índia (38) mostrou prevalência do P-ANCA de apenas 3% nos pacientes com RCUI. No Japão foi observada alta prevalência do P-ANCA tanto na RCUI (63,5%) quanto na DC (72,1%), sendo maior na DC do que na RCUI (37).

No Brasil, poucos são os dados disponíveis de trabalhos publicados. Num estudo realizado com 70 pacientes com DII, dos quais 40 com DC e 30 com RCUI, foi feita a determinação somente do ASCA, com frequência encontrada de 80% para DC e 10% para a RCUI (39). Outro trabalho envolveu somente o estudo do P-ANCA em 40 pacientes com RCUI e 36 pacientes com DC, onde se verificou a presença de P-ANCA apenas em 27,5% dos pacientes com RCUI e 14% dos com DC. Até o momento, não conhecemos nenhum estudo nacional publicado envolvendo uma casuística relevante com a determinação conjunta dos dois anticorpos (40).

Tabela 8. Prevalência de ASCA e P-ANCA na DII , de acordo com vários autores

<u>Anticorpos</u>	<u>Estudo</u>	<u>N*</u>	<u>Positivo de anticorpos %</u>			
			<u>DC</u>	<u>RCUI</u>	<u>Controles patológicos</u>	<u>Controles sadios</u>
<u>ASCA</u>	<i>Peeters et al. (20)</i>	407/147/74/157	60	14	11	3,2
	<i>Koutrobakis et al. (59)</i>	97/56/0/150	39	11	-	0,7
	<i>Quinton et al. (22)</i>	101/100/27/163	61	12	11	0,6
	<i>Ruemmele et al. (35)</i>	36/131/78/0	55	5	5	-
	<i>Hoffenberg et al. (60)</i>	25/20/74/0	60	0	4	-
	<i>Linskens et al. (58)</i>	50/51/0/20	72	12	-	15
	<i>Lawrance et al. (61)</i>	50/50/0/50	56	50	-	4
	<i>Presente estudo</i>	102/98/0/54	52,9	27,6	-	5,6
<u>P-ANCA</u>	<i>Peeters et al. (20)</i>	407/147/74/157	6	50	8	2,5
	<i>Koutrobakis et al. (59)</i>	97/56/0/150	16	67	-	0
	<i>Quinton et al. (22)</i>	101/100/27/163	15	66	7,5	0,6
	<i>Ruemmele et al. (35)</i>	36/131/78/0	13	57	0	-
	<i>Hoffenberg et al. (60)</i>	25/20/74/0	0	60	11	-
	<i>Linskens et al. (58)</i>	50/51/0/20	14	63	-	10
	<i>Lawrance et al. (6)</i>	50/50/0/50	10	44	-	10
	<i>Presente estudo</i>	102/98/0/54	16,7	61,2	-	5,6

* Número de pacientes; DC = doença de Crohn; RCUI = retocolite ulcerativa inespecífica.

A frequência dos anticorpos P-ANCA e ASCA nos grupos controles estudados é baixa e não tem variado significativamente, principalmente nos controles sadios, como pode ser constatado nos dados da Tabela 8.

Em nossa população de indivíduos, a frequência do ASCA (IgA e/ou IgG) mostrou-se relativamente elevada nos pacientes com RCUI, alcançando o valor de 27,6%. Embora esta porcentagem seja considerada um tanto quanto elevada em relação à maioria dos trabalhos, um estudo recente conduzido na Holanda revelou frequência semelhante do ASCA em pacientes com RCUI (7).

Tão importante quanto a determinação da prevalência dos anticorpos P-ANCA e ASCA é a avaliação da acurácia destes marcadores na diferenciação entre DC e RCUI. Os resultados obtidos em nossa pesquisa, em relação à acurácia dos anticorpos, determinada através da avaliação da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo e seus respectivos intervalos de confiança (IC) estão demonstrados na Tabela 2. Nela podemos observar uma sensibilidade de 52,9% e especificidade de 72,4% do ASCA para a DC. Entretanto, quando associado com P-ANCA negativo, percebemos uma redução da sensibilidade (45,1%), porém considerável aumento da especificidade (89,8%).

Em relação à RCUI e a presença do P-ANCA, observamos sensibilidade e especificidade maiores (respectivamente 61,2% e 83,3%). Quando analisado em conjunto com a presença do ASCA negativo, como já esperado, houve uma diminuição da sensibilidade (43,9%), porém aumento da especificidade (91,2%). Quanto aos valores preditivos positivos, foram obtidos altos índices, tanto para RCUI quanto para DC (entre 67 e 83%), particularmente quando os dois marcadores foram analisados em conjunto (Tabela 2). Já os valores preditivos negativos foram mais baixos (entre 60 e 69%), refletindo a sensibilidade também mais baixa dos testes.

Comparando-se os resultados publicados por outros autores referentes à sensibilidade e especificidade, resumidos na Tabela 09, podemos constatar que nossos resultados não diferiram da maioria deles. Assim, como nos trabalhos citados, constatamos baixa sensibilidade, com valores abaixo de 60% quando dosados em conjunto P-ANCA e ASCA, tanto para a RCUI quanto para a DC. Por outro lado, alcançamos níveis elevados de especificidade, em torno de 90%, na avaliação conjunta dos anticorpos tanto para RCUI quanto para DC.

Tabela 09 – Acurácia do P-ANCA e ASCA para diferenciar RCUI de DC em pacientes com DII

	ESTUDO					
	<i>Quinton et al. (22)</i>	<i>Linskens et al (58)</i>	<i>Koutroubakis et al.(59)</i>	<i>Sandbom et al. (21)</i>	<i>Peeters et al. (20)</i>	Presente estudo
RCUI, nº	101	51	97	83	147	98
DC, nº	100	50	56	79	407	102
<u>Sensibilidade,</u>						
<u>%</u>						
ASCA+ (DC)	61	72	39	44	60	52,9
P-ANCA+ (RCUI)	65	63	67	63	50	61,2
ASCA+/P-ANCA- (DC)	49	64	30	38	56	45,1
P-ANCA+/ASCA- (RCUI)	57	51	58	55	44	43,9
<u>Especificidade,</u>						
<u>%</u>						
ASCA+ (DC)	88	82	89	87	86	72,4
P-ANCA+ (RCUI)	85	86	84	75	94	83,3
ASCA+/P-ANCA- (DC)	97	94	97	94	92	89,8
P-ANCA+/ASCA- (RCUI)	97	94	88	81	98	91,2

Como já anteriormente relatado, o padrão associado à DC é ASCA+/P-ANCA- e à RCUI é P-ANCA+/ASCA-. Desta forma, a avaliação combinada do P-ANCA e do ASCA possui alta especificidade (maior que 90% na maioria dos estudos e maior que 80% em todos), para diferenciar RCUI de DC, melhor que a avaliação separada dos anticorpos, porém este aumento da especificidade relaciona-se com diminuição da sensibilidade (31).

Neste contexto, vale ressaltar que quando avaliamos o desempenho da pesquisa do P-ANCA e do ASCA com a finalidade de distinguir pacientes com DII em geral (DC e RCUI), observamos baixas sensibilidades, mesmo com a associação dos anticorpos, mas altas especificidades, chegando a 100% (tabela 1).

Devem-se ter cuidado com as comparações entre os resultados obtidos pelas diversas pesquisas realizadas para determinação dos anticorpos P-ANCA e ASCA. As diferenças entre os resultados alcançados por diferentes grupos podem ser explicadas, provavelmente, pela falta de padronização da metodologia empregada ou pela heterogeneidade da doença (4). Isso foi demonstrado em alguns trabalhos que tiveram como objetivo avaliar a variação existente entre as metodologias empregadas na detecção do P-ANCA e ASCA na DII (5,51,62).

A determinação do P-ANCA pode sofrer variações importantes, decorrentes não só de diferenças entre os métodos usados, mas também de interpretações que podem variar entre um observador e outro (62). Em virtude disso, grupos de estudo de cooperação internacional se reuniram com o propósito de tentar estabelecer uma padronização do método para detecção do ANCA. Os resultados desse consenso foram publicados em 1999, contudo, esta padronização é empregada e amplamente

aceita nos pacientes portadores de granulomatose de Wegener (C- ANCA) e vasculites (P-ANCA) (26).

Diferentemente dos ANCAs presentes nas vasculites e na granulomatose de Wegener, em que os antígenos alvos já são conhecidos (C-ANCA reconhece como antígeno a proteinase 3 e P-ANCA reconhece como antígeno a mieloperoxidase), o real antígeno relacionado ao P-ANCA associado à DII, ainda não foi identificado (63,64). O padrão de anticorpo perinuclear P-ANCA que é encontrado nos pacientes com RCUI e DC é usualmente negativo para mieloperoxidase, havendo evidências de que o antígeno primário nesses pacientes esteja localizado no núcleo e não no citoplasma (30,65). Alguns autores têm sugerido que tal antígeno localizado no núcleo e que é reconhecido pelo P-ANCA na DII, corresponde, na verdade, a um complexo envolvendo epitopos associados com a histona H-1, proteínas nucleares de alta mobilidade (HMG-1 e HMG-2) e uma proteína de 50-kilodalton (66,67,68,69).

O fato de não se saber exatamente qual o antígeno que é reconhecido pelo P-ANCA na DII, dificulta a padronização de uma metodologia para a detecção deste anticorpo como ocorre em pacientes com vasculites e granulomatose de Wegener.

Como consequência, na DII a imunofluorescência microscópica é a única técnica amplamente viável para a pesquisa do P-ANCA (62). Entretanto, os substratos disponíveis comercialmente ainda não estão padronizados e parte da discrepância nos resultados pode estar relacionada a este fato. Além disso, o método de análise por imunofluorescência microscópica depende da habilidade do observador, da qualidade dos reagentes e do equipamento utilizado (62).

Vale comentar ainda a questão da utilização do etanol e da formalina para fixação dos neutrófilos, bem como as controvérsias e implicações a este respeito. A natureza

perinuclear de algumas reações do ANCA, como a que ocorre quando este anticorpo reconhece os antígenos mieloperoxidase ou elastase, é um artefato que ocorre pela fixação dos neutrófilos com álcool, o que faz com que ocorra redistribuição das proteínas granulares citoplasmáticas carregadas positivamente para ao redor do núcleo, atraídas pelas proteínas nucleares carregadas negativamente. Nos neutrófilos tratados com formalina, entretanto, o P-ANCA associado às vasculites, se converte no padrão citoplasmático (C-ANCA). A formalina fixa e previne que ocorra a migração artefactual das proteínas citoplasmáticas carregadas positivamente, como a mieloperoxidase, em direção à membrana nuclear carregada negativamente nos neutrófilos fixados com etanol. Isso faz com que ocorra conversão do padrão perinuclear associado às vasculites em padrão citoplasmático (31).

Embora alguns autores defendam o uso de rotina da formalina na detecção do P-ANCA (29), outros não constataram benefício com a sua utilização (70,71).

De qualquer forma, o método padrão para a detecção do ANCA continua sendo a imunofluorescência indireta em neutrófilos fixados com etanol, como previamente validado por “workshops” internacionais (62), sendo esta a metodologia empregada em nosso estudo.

O mesmo ocorre em relação ao método de ELISA inicialmente como “screening” para posterior análise por imunofluorescência. Não há unanimidade quanto ao seu emprego na rotina (21).

Em relação à determinação do ASCA, também notamos que possa ocorrer falta de padronização na sua determinação. Alguns estudos sobre ASCA e DC, comparando as análises de laboratórios entre si, revelaram uma deficiente concordância (8) enquanto outros possuíram concordância maior entre si. Na análise

realizada por Annese et al (51), comparando a determinação do ASCA por quatro “kits” comerciais de laboratórios diferentes (Lille, Inova, Medimar e Bouty) em 27 pacientes com DC, 28 pacientes com RCUI e 5 pacientes controles sadios. Evidenciou-se concordância completa entre os quatro laboratórios somente em 18,3% das amostras. Quando se realizaram as comparações, tendo arbitrariamente os resultados do laboratório Lille como corretos, verificou-se uma concordância com os outros “kits” dos laboratórios de 60%, 57% e 62% respectivamente para Inova, Medimar e Bouty, com melhores concordâncias obtidas com os “Kits” comerciais Inova e Bouty. Resultados semelhantes com deficiente concordância entre os testes, também foram verificados por Vermeire et al (72). Já Sandborn et al (21) comparando dois “kits” comerciais (Lille e Prometheus) e Klebl et al (73) comparando quatro diferentes “kits” (Aeskulan, Euroimmun, Medipan e Inova) conseguiram demonstrar concordância razoável.

No trabalho realizado por Annese et al (51), comparando os “kits” Lille e Inova em outro grupo de 80 pacientes com DC, as frequências de ASCA obtidas foram de 65% e 66%, respectivamente, com concordância entre os dois testes de 70%.

Assim, podemos observar que o “kit” comercial – Inova, empregado em nosso estudo para determinação do ASCA, é amplamente utilizado em outros centros de pesquisa e com resultados compatíveis com os demais laboratórios, o que nos dá maior segurança quanto aos resultados encontrados em nossa casuística no presente estudo.

Alguns detalhes técnicos implicados na realização da determinação do ASCA em si devem ser considerados, pois explicam em parte, porque podem ocorrer discordâncias de resultados entre os “kits” comerciais utilizados, quando as mesmas

amostras são analisadas, inclusive com o mesmo operador (62). Devem-se levar em consideração diferenças no *S. cerevisiae* utilizado, o seu processo de purificação, a forma como as lâminas são cobertas a variação existente na forma usada pelos diferentes operadores na diluição sérica e tempo de incubação. Outro aspecto a ser considerado são os diferentes valores de “cut-off” adotados pelos laboratórios e a indeterminação do epítipo real envolvido como antígeno (51).

Apesar da sensibilidade e especificidade dos anticorpos P-ANCA e ASCA estarem bem definidas em relação à DII, o seu papel atual na prática clínica ainda não foi totalmente esclarecido.

Estudos têm correlacionado os anticorpos P-ANCA e ASCA presentes nos pacientes com RCUI e DC, com características clínicas específicas, numa tentativa de se determinar padrões fenotípicos e se definir subgrupos (20,43), todavia, estes estudos ainda são na sua maioria, controversos entre si (51).

Em nossa pesquisa, foram avaliadas possíveis associações entre a presença dos anticorpos P-ANCA e ASCA, com características clínicas e demográficas, tanto para RCUI quanto para DC, como pode ser observado nas tabelas 6 e 7.

Alguns estudos em pacientes com RCUI, descrevem uma associação entre a presença do P-ANCA + com a extensão da doença e atividade, ou seja, com doença mais agressiva envolvendo todo o cólon, resistência ao tratamento clínico e maior risco de cirurgia (23,41,42), porém, grande parte dos trabalhos não evidenciaram tais associações. O mesmo ocorreu em relação à presença do ASCA+ (76,77).

Nos pacientes com RCUI investigados em nossa pesquisa, não foram observadas nenhum tipo de associação entre a presença dos anticorpos estudados com características clínicas e demográficas.

Em relação ao fator gravidade nos pacientes com RCUI e P-ANCA+, a maior parte dos pacientes possuía a doença controlada (estágio leve) e no que diz respeito à história de cirurgia prévia, somente 3 pacientes dos 86 avaliados haviam, até então, sido submetidos à intervenção cirúrgica, se traduzindo num número muito pequeno para avaliar uma possível correlação com a positividade dos anticorpos. Quando avaliado o uso de imunossupressores, o grupo que não usava era maior naqueles com P-ANCA+, enquanto que dentre aqueles que faziam uso, o número de pacientes que possuíam o marcador positivo e negativo foram parecidos. Já em relação à localização da doença, podemos perceber que apesar de haver um número maior de pacientes com P-ANCA+ com pancolite, não houve significância estatística ($p=0,79$).

Nos pacientes com DC, alguns estudos publicados evidenciaram associação de certas características clínicas com a positividade dos anticorpos P-ANCA e ASCA, mas principalmente com a presença do ASCA+.

A presença do ASCA+ tem sido fortemente associada aos pacientes que possuem DC com acometimento do intestino delgado (75,77). Alguns estudos também evidenciaram associação com comportamento mais agressivo, ou seja, com as formas penetrantes e fibroestenotantes (22,43,44,75). No entanto, muitos outros trabalhos não evidenciaram tal associação, bem como com outras características clínicas - como história de cirurgias ou tratamento mais agressivo, clínico ou cirúrgico (51,77).

Em nosso trabalho não foi constatada associação entre a presença do ASCA+ e acometimento do intestino delgado. Também não foi verificada associação com a presença das formas penetrantes e estenosantes.

Não observamos correlações entre a positividade do ASCA na DC com características demográficas relacionadas a sexo, cor e idade. O mesmo ocorreu quando avaliamos possível associação com manifestações extra-intestinais, que corresponde ao que é descrito na literatura.

Em relação à atividade da doença, não encontramos associação com a positividade do ASCA. Podemos perceber que a maioria dos pacientes com DC estudados, apresentava-se em fase de remissão ou com doença leve, o que pode ter prejudicado esta avaliação. Entretanto, a maioria dos trabalhos não mostrou associação entre a atividade da doença com a presença do anticorpo (49,51).

No presente estudo, podemos constatar nos pacientes com DC e ASCA+, correlação com significância estatística em relação ao uso de drogas imunossupressoras e infliximab ($p=0,008$). Porém, não podemos comparar este achado com os de outros trabalhos, por não serem encontrados dados relevantes a este respeito. Todavia, alguns estudos avaliaram a resposta ao tratamento medicamentoso empregado em relação à presença dos anticorpos, com resultados ainda controversos (31). Tal associação não foi avaliada em nosso estudo.

No que diz respeito à DC e presença do P-ANCA+ , alguns trabalhos evidenciaram neste grupo de pacientes características clínicas, endoscópicas e histológicas semelhantes à RCUI – (RCUI-símile) (35,43,44), definindo um subgrupo específico, porém, outros estudos não conseguiram definir esta associação (22,59). Em nossa pesquisa não constatamos esta correlação. Também não verificamos associações com as demais características clínicas e demográficas estudadas, as quais não são observadas menções em outros estudos.

CONCLUSÕES

---

6 Conclusões

- 1) A prevalência do P-ANCA encontrada na população estudada correspondeu a 61,1% e 16,7% para RCUI e DC respectivamente, enquanto que a do ASCA (IgA e IgG) correspondeu a 27,6% e 52,9% para RCUI e DC respectivamente; Os resultados encontrados foram compatíveis com os descritos nos principais trabalhos publicados.
- 2) Em relação à sensibilidade e especificidade encontrada com a associação dos marcadores P-ANCA e ASCA na DII, verificamos baixa sensibilidade (45,1% com a combinação ASCA+/P-ANCA- para a DC e 43,9% com a combinação P-ANCA+ /ASCA- para a RCUI) , porém alta especificidade, com níveis em torno de 90% tanto para RCUI quanto para DC. Os resultados obtidos em relação à acurácia em nossa população foram semelhantes aos encontrados em outras populações estudadas.
- 3) Foi observada nos pacientes com DC e ASCA+ associação com o maior uso de drogas imunossupressoras e infliximab.
- 4) Não foram observadas associações entre a presença dos anticorpos P-ANCA+ e ASCA+ com as demais características clínicas e demográficas analisadas nos pacientes com RCUI e DC.

REFERÊNCIAS

---

7 Referências

1. Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol 1989; 24 (Suppl 170): 2-6).
2. Nakamura R, Matsutani M, Barry M Advances in clinical laboratory tests for inflammatory bowel disease. Clinica Chimica Acta 2003;335: 9-20
3. Damião, Adérson O. M. C. e Sipahi, Aytan. “Doença inflamatória intestinal” in CASTRO, Luiz de Paula e COELHO, Luiz Gonzaga Vaz. *Gastroenterologia*. Rio de Janeiro, Medsi, 2004, 1105-1149p
4. Rutgeerts, P; Vermeire, S. “Clinical value of the detection of antibodies in the serum for diagnosis and treatment of inflamammatory bowel disease”. Gastroenterology 1998, 115:1006-1002
5. Vermeire S, Peeters M, Rutgeerts P. Diagnostic approach to IBD. Hepatogastroenterology 2000;47:44-8
6. Bamias G, Nyce MR, De La Rue AS, Cominelli F. New concepts in the pathophysiology of inflammatory bowel disease. Ann Intern Med 2005; 143: 895 – 904
7. Korzenik JR, Podolsky DK. Evolving knowledge and therapy of inflammatory bowel disease . Nat Rev 2006; 5: 197 – 209
8. Andrés PG, Freedman LS. Epidemiology and the natural course of inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis 1999;28:255-81
9. Farrel RJ, Banerjee S, Peppercom MA. Recent advances in inflammatory bowel disease. Crit Rev Clin Lab Sci 2001;38:33-108.
10. Papadakis KA, Targen AS. Current theories of the causes of inflammatory bowel disease. Gastroenterol Clin North Am 1999;28:283-96
11. Yang H, Rotter JI. The genetics of ulcerative colitis and Crohn’s disease. In: Kirsner JB ed. Inflammatory Bowel Disease. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 2000:250-279
12. Roussomoustakaki M, satsangi J, Welsk K et al. Genetic markers may predict disease behaviour in patients with ulcerative colitis. Gastroenterology 1997; 112:1845-1853
13. Watts DA, Satsangi J. The genetic jigsaw of inflammatory bowel disease. Gut 2002;50(Suppl. III):31-6

14. Bonen D, Cho J. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2003; 124:521-36
15. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603
16. O'Neil LAJ. How NOD-ing off leads to Crohn disease. *Nat Immunol* 2004; 5: 776 – 778
17. Judge T, Lichenstein GR. The NOD2 and Crohn's disease: Another triumph for molecular genetics. *Gastroenterology* 2002;122:826-8
18. Truelove SC, Witts LJ. Cortisone in ulcerative colitis. Final report on a therapeutic trial. *Br Med J* 1995; 2:1041-1048
19. Best WR, Beckett JM, Kern Jr. F. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 1976; 70:439-444
20. Peeters M, Joosens S, Vermeire S, et al. Diagnostic value of anti-saccharomyces cerevisiae and antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2001;96:730-4
21. Sandborn WJ, Loftus EV JR, Colombel JF, Fleming KA, seibold F, et al. Evaluation of serologic disease markers in a population-based cohort of patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm bowel dis* 2001;7:192-201
22. Quinton JF, Sendid B, Reumaux D, Duthilleul P, Cortot A, Grand-bastien B, et al. Anti-saccharomyces cerevisiae mannan antibodies combined with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease : prevalence and diagnostic role. *Gut* 1998;42:788-91
23. Van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, et al. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and maker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet*. 1985;425-429
24. Savage CO, Winearls CG, Jones S, et al. Prospective study of radioimmunoassay for antibodies against neutrophil cytoplasm in diagnosis of systemic vasculitis. *Lancet*. 1987; I:1389-1393
25. Hagen EC, daha MR, Hermans J, Andrassy K, Csemok E, Gaskin G, et al. Diagnostic value of standardized assays for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis. EC/BCR project for ANCA assay standardization. *Kidney Int* 1998;53:743-53

26. Savige J, Gills D, FRCPA et al. International consensus statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Am J Clin Pathol* 1999;111:507-513
27. Niles JL, McCluskey RT, Ahmad MF, et al. Wegener's granulomatosis autoantigen is a novel neutrophil serine proteinase. *Blood*. 1989;74:1888-1893
28. Falk RJ, Jennette JC. Antineutrophil cytoplasmic auto-antibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotising and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med*. 1988;318:1651-1657
29. Terjung B, Worman HJ, Herzog V et al. Differentiation of antineutrophil nuclear antibodies in inflammatory bowel and autoimmune liver diseases from antineutrophil cytoplasmic antibodies (P-ANCA) using immunofluorescence microscopy. *Clin Exp Immunol* 2001;126:36-46
30. Vidrich A, Lee J, James E, Cobb L, Targan S. Segregation of P-ANCA antigenic recognition by Dnase treatment of neutrophils: ulcerative colitis, type I autoimmune hepatitis, and primary sclerosing cholangitis. *J Clin Immunol* 1995;15(6):293-9
31. Bossuyt X. Serologic markers in inflammatory bowel disease. *Clinical Chemistry* 2006; 52(2):171-181
32. Cohavy O, Harth G, Horwitz M, Eggena M, et al. Identification of a novel mycobacterial histone H1 homologue (HupB) as an antigenic target of P-ANCA monoclonal antibody and serum immunoglobulin A from patients with Crohn's disease. *Infect Immun* 1999;67:6510-7
33. Wei B, Dalwadi H, Gordon LK et al. Molecular cloning of a *Bacteroides caccae* tonB-linked outer membrane protein identified by an inflammatory bowel disease marker antibody. *Infect Immun* 2001;69:6044-54
34. Vasiliauskas E. Serum immune markers in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Endosc News* 1997 (october); p.1-5
35. Ruemmele FM, Targan SR, Levy G, Dubinsky M, Braum J, Seidman EG. Diagnostic accuracy of serological assays in pediatric inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1998;115:822-9
36. Hertevig E, Wieslander J, Johansson C et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in chronic inflammatory bowel disease. Prevalence and diagnostic role. *Scand J Gastroenterol* 1995; 30:693-698
37. Sugi K, Saitoh O, Matsuse R et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in Japanese patients with inflammatory bowel disease: prevalence and recognition of putative antigens. *Am J Gastroenterol* 1999; 1304-1312

38. Habeeb MA, Rajalingam R Dhar A. et al. HLA association and occurrence of autoantibodies in Asian-Indian patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1997;99 92:772-776
39. Steinwurz F, Scheinberg M Diagnóstico sorológico de doença inflamatória intestinal (ASCA e ANCA): avaliação de 70 casos. *Ged* 2001 mar/abr; v20, n2: 41-42
40. Cabral V, Miszputen S, Catapani W Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in brazilian patients with inflammatory bowel disease. *Hepato-Gastroenterology* 2003;50: 412-415.
41. Seidman EG. Inflammatory bowel diseases. In: Roy C, Silverman A, Alagille D, editors. *Pediatric gastrointestinal disease*. 4th ed. St. Louis: Mosby; 1996, p. 585-605
42. Targan S, Murphy LK. Serologic and mucosal markers of ulcerative colitis and Crohn's disease. Implications of pathophysiology for diagnosis. In: scholmerich J, Kruis W, Goebell H, et al, editors. *Inflammatory bowel disease – pathophysiology as a basis of treatment*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishing; 1993. p. 283-6.
43. Vasiliauskas EA, Plevy SE, Landers CJ, Binder SW, Ferguson DM, Yang H, et al. Perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with Crohn's disease define a clinical subgroup. *Gastroenterology* 1996; 110:1810-9
44. Vasiliauskas EA, Kam LY, Karp LC, Kam LY, et al. Marker antibody expression stratifies Crohn's disease into immunologically homogeneous subgroups with distinct clinical characteristics. *Gut* 2000; 47:487-96
45. Main J, Mckenzie H, Yeaman GR et al. Antibody to *Saccharomyces cerevisiae* (baker's yeast) in Crohn's disease. *Br Med J* 1988; 297:1105-1106
46. Mckenzie H, Main J, Pennington CR et al. Antibody to select strains of *Saccharomyces cerevisiae* (baker's and brewer's yeast) and *Candida albicans* in Crohn's disease. *Gut* 1990; 31: 536-538
47. Heelan BT, Allan S, Barnes RM. Identification of a 200kda glycoprotein antigen of *Saccharomyces cerevisiae*. *Immunol Lett* 1991; 28:181-5
48. Sendid B, Colombel JF, Jacquinot PM, Faille C, et al. Specific antibody response to oligomannosidic epitopes in Crohn's disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996; 3:219-26
49. Teml A, Kratzer V, Schneider B, et al. *Anti-saccharomyces cerevisiae* antibodies: a stable marker for Crohn's disease during steroid and 5-aminosalicylic acid treatment. *Am J gastroenterol* 2003, 98:2226-2231

50. Beaven S, Abreu M Biomarkers in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2004; 20: 318-327
51. Annese V, Piepoli F Lombardi A et al. *Anti-Saccharomyces cerevisiae* mannan antibodies in inflammatory bowel disease: comparison of different assays and correlation with clinical features. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 1143-1152
52. Seibold F, Stich O, Hufnagi R, et al. *Anti-Saccharomyces cerevisiae* antibodies in inflammatory bowel disease: a family study. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36:196-201
53. Sutton CL, Yang H, Li Z, Rotter JI, Targan SR, Braun J. Familial expression of *anti-Saccharomyces cerevisiae* mannan antibodies in affected and unaffected relatives of patients with Crohn's disease. *Gut* 2000; 46:58-63
54. Gardner , M. J.; Altman, D. G. *Statistics with confidence – Confidence intervals and Statistical Guidelines*. 1^a Ed. London, British Medical Journal, 1989.
55. Altman, D. E. *Practical Statistics for Medical Research*. 1^a Ed., London, Chapman & Hall, 1991.
56. Kirkwood, B. R. *Essentials of Medical Statistics*. 1^a Ed., Oxford, Blackwell Science Publications, 1988.
57. Hennekens, C. H.; Buring, J. E. *Epidemiology in Medicine*. Boston/Toronto, Little, Brown and Company, 1987.
58. Linskens RK, Mallan-Hent RC, Groothuismink A. et al. Evaluation of serological markers to differentiate between ulcerative colitis and Crohn's disease: P-ANCA, ASCA and agglutinating antibodies to anaerobic coccoid rods. *Europ Jour of Gastroenterol & hepatol* 2002, 14:1013-1018
59. Koutroubakis IE, Petinaki E, Mouzas AI, et al. *Anti-Saccharomyces cerevisiae* mannan antibodies and antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in greek patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2001;96:449-54
60. Hoffenberg EJ, Fidanza S, Sauaia A, Serologic testing for inflammatory bowel disease. *J Pediatr* 1999; 134:447-52
61. Lawrance CI, Murray K, Hall A, et al. A prospective comparative study of ASCA and P-ANCA in chinese and caucasian IBD patients. *Am. J Gastroenterol* 2004;99:2186-2194

62. Joossens S, Daperno M, Shums Z, et al. Interassay and interobserver variability in the detection of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in patients with ulcerative colitis. *Clin Chem* 2004;50:1422-5
63. Rump JA, Scholmerich J, Gross V, et al. A new type of perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibody (P-ANCA) in ulcerative colitis but not in Crohn's disease. *Immunology* 1990; 181:406-13
64. Saxon A, Shanahan F, Landers C, Ganz T, Targan S. a distinct subset of antineutrophil cytoplasmic antibodies is associated with inflammatory bowel disease. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 86:202-10
65. Yang P, Bohr J, Tysk C, et al. antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease and collagenous colitis: no association with lactoferrin, B-glucuronidase, myeloperoxidase, or proteinase 3. *Inflammatory Bowel Diseases* 1996; 2:173-7
66. Eggen SM, Cohavy O, Parseghian MH, et al. Identification of histone H1 as a cognate antigen of the ulcerative colitis – associated marker antibody P-ANCA. *J Autoimmun* 2000 (feb);14(1):83-97
67. Sobajima J, Ozaki S, Uesugi S, et al. Prevalence and characterization of perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (P-ANCA) directed against HMG1 and MG2 in ulcerative colitis (UC). *Clin Exp Immunol* 1998; 111:402-7
68. Sobajima J, ozaki S, Uesugi H, et al. High mobility group (HMG) non histone chromosomal proteins HMG1 and HMG2 are significant target antigens of perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in autoimmune hepatitis. *Gut* 1999; 44:867-73
69. Terjung B, Spengler U, Sauerbruch T, Worman H. "Atypical p-ANCA" in IBD and hepatobiliary disorders react with a 50 kilodalton nuclear envelope protein of neutrophils and myeloid cell lines. *Gastroenterology* 2000; 119:310-22
70. Chowdhury SMZ, Broomhead V, Spickett GP, Wilkinson R. Pitfalls of formalin fixation for determination of antineutrophil cytoplasmic antibodies. *J. Clin. Pathol.* 1999; 52:475-477
71. Spickett GP, Broomhead V. Formalin fixation and patterns of antineutrophil cytoplasmic antibodies. *J Clin Pathol* 1995; 48:89-90
72. Vermeire S, Joossens S, Peeters M, et al. Comparative study of ASCA (anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibody) assays in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2001; 96:449-54
73. Klebl FH, Bataille F, Hofstadter F et al. Optimising the diagnostic value of *Saccharomyces cerevisiae*-antibodies (ASCA) in Crohn's disease. *Int J Colorectal DIS* 2004; 19:319-24

74. Mallant-Hent R, Mooij M, Blomberg B, Bodegraven A, Savelkoul P. Correlation between *Saccharomyces cerevisiae* DNA in intestinal mucosal samples and anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies in serum of patients with IBD. *World J Gastroenterol* 2006 janeiro 14; 12(2):292-297.
75. Mow WS, Vasilias EA, Lin YC, et al. Association of antibody responses to microbial antigens and complications of small bowel Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004; 126:414-24
76. Reumaux D, Colombel JF, Masy E, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic auto-antibodies (ANCA) in ulcerative colitis (UC): No relationship with disease activity. *Inflamm Bowel Dis* 2001; 6:270-4
77. Reese EG, Constantinides AV, Simillis C, et al. Diagnostic precision of anti – *Saccharomyces cerevisiae* antibodies and perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2006; 101:2410-2422

APÊNDICE

Figura 1 - C-ANCA fixado sobre etanol

Figura 2 - P-ANCA "atípico" fixado sobre etanol