



VIVIANE SOARES RODRIGUES

*NÍVEIS SÉRICOS E TECIDUAIS DE ADIPOCINAS, PERFIL NUTRICIONAL E
PAPEL DO TECIDO MESENTERIAL NA DOENÇA DE CROHN*

CAMPINAS

2013

i



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

VIVIANE SOARES RODRIGUES

**NÍVEIS SÉRICOS E TECIDUAIS DE ADIPOCINAS, PERFIL NUTRICIONAL E
PAPEL DO TECIDO MESENTERIAL NA DOENÇA DE CROHN**

Orientadora: Prof^ª. Dra. Raquel Franco Leal

Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Marciane Milanski Ferreira

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção do título de Mestra em Ciências.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO/TESE DEFENDIDA PELA ALUNA VIVIANE SOARES RODRIGUES E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. RAQUEL FRANCO LEAL.

Assinatura do(a) Orientador(a)

CAMPINAS

2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Rodrigues, Viviane Soares, 1985-
R618n Níveis séricos e teciduais de adipocinas, perfil nutricional e papel do tecido mesenterial na doença de Crohn / Viviane Soares Rodrigues. -- Campinas, SP.: [s.n.], 2013.

Orientador: Raquel Franco Leal.
Coorientador: Marciane Milanski Ferreira.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Doença de Crohn. 2. Adiponectina. 3. Leptina. 4. Tecido adiposo. I. Leal, Raquel Franco. II. Ferreira, Marciane Milanski. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Serum and tissue levels of adipokines, nutritional profile and the role of mesenteric tissue in Crohn disease

Palavras-chave em inglês:

Crohn disease
Adiponectin
Leptin
Adipose tissue

Área de concentração: Fisiopatologia Cirúrgica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Marciane Milanski Ferreira [Coorientador]
Rosângela Maria Neves Bezerra
Marcia Queiroz Latorraca

Data da defesa: 25-07-2013

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Cirurgia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

VIVIANE SOARES RODRIGUES

Orientador (a) PROF(A). DR(A). RAQUEL FRANCO LEAL

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). MARCIANE MILANSKI _____

2. PROF(A). DR(A). ROSÂNGELA MARIA NEVES BEZERRA _____

3. PROF(A). DR(A). MARCIA QUEIROZ LATORRACA _____

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

Data: 25 de julho de 2013

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Silvia e José, ao meu irmão José Eduardo, e ao meu namorado Rodnei pela paciência, dedicação e incentivo aos estudos, pelos esforços incessantes ao longo dos anos, e amor incondicional, exemplos de fé, força e coragem.

À **Deus**, por estar sempre presente.

À **Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)**, pela oportunidade de tornar possível minha formação profissional.

À **Profa. Dra. Raquel Franco Leal**, Professora Docente do Departamento de Cirurgia, Disciplina de Moléstias do Aparelho Digestório (FCM-UNICAMP), pela honra de tê-la como minha orientadora, pela confiança, estímulo à pesquisa e a participação de eventos científicos, me faltam palavras para expressar o quanto você foi importante na minha formação profissional e pessoal. Meus sinceros agradecimentos pela amizade e companheirismo.

À **Profa. Marciane Milanski**, Professora Docente de Nutrição da Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA-UNICAMP), pela oportunidade de crescimento na área de experiência docente, pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho como minha co-orientadora.

À **aluna de Doutorado Carla Evelyn**, pelo empenho em me auxiliar a aprender as técnicas realizadas no laboratório. Por estar presente nos momentos mais difíceis, pois é um privilégio tê-la como amiga, pelo carinho, pela paciência, pelos conselhos, pelo incentivo e grande contribuição intelectual.

Ao **Prof. Dr. João José Fagundes**, Professor Livre-Docente do Departamento de Cirurgia, Grupo de Coloproctologia da Disciplina de Moléstias do Aparelho Digestório (FCM-UNICAMP), pelo imenso prazer em conhecê-lo, e por ter a oportunidade de acompanhar seus ensinamentos.

Ao **Prof. Dr. Cláudio Saddy Rodrigues Coy**, Professor Livre-Docente do Departamento de Cirurgia, Grupo de Coloproctologia da Disciplina de Moléstias do Aparelho Digestório (FCM-UNICAMP), exemplo de dedicação e incentivo à pesquisa.

Aos doentes voluntários, que participaram deste estudo, possibilitando o desenvolvimento deste trabalho, Muito obrigada.

Aos profissionais do Gastrocentro (HC-UNICAMP), pela imensa paciência e dedicação durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório de Sinalização Celular (FCM-UNICAMP), local onde foram desenvolvidos os ensaios experimentais com auxílio financeiro parcial da FAPESP, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo e da FAEPEX, Fundo de Apoio ao ensino, à Pesquisa e à Extensão da UNICAMP.

À Faepex e Fapesp, pelo incentivo financeiro.

*"A mente que se abre a uma nova idéia,
jamais voltará ao seu tamanho original."*

Albert Einstein

RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xx
1- INTRODUÇÃO.....	23
1.1- Considerações Gerais.....	24
1.1.2- Aspectos nutricionais na doença de Crohn	25
1.1.3- Tecido Adiposo Mesenterial na DC.....	27
1.2- Revisão da literatura.....	28
1.2.1- Adipocinas: adiponectina e leptina.....	28
1.2.2- Vias celulares envolvidas com adiponectina e leptina.....	31
1.2.3- Outras adipocinas na doença de Crohn	33
2- OBJETIVO.....	36
3- CASUÍSTICA E MÉTODO.....	38
3.1- Casuística.....	39
3.1.1- Fatores de exclusão.....	40
3.1.2- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	40
3.2- Método.....	40
3.2.1- Enzime-linked immunosorbent assay (ELISA).....	41
3.2.2- Imunoblot.....	47
3.2.3- Avaliação antropométrica.....	51
3.2.4- Exames laboratoriais de rotina.....	53
3.2.5- Análise estatística.....	53

4- RESULTADOS.....	55
4.1- Níveis séricos de adiponectina e leptina.....	56
4.2- Expressão de adiponectina no tecido mesenterial.....	57
4.3- Níveis séricos de proteína C reativa.....	58
4.4- Níveis séricos de colesterol total.....	59
4.5- Níveis séricos de triglicérides.....	60
4.6- Níveis séricos de pré-albumina.....	61
4.7- Dados Antropométricos.....	62
4.7.1- Índice de massa corporal.....	62
4.7.2- % Gordura corporal.....	63
4.7.3- Avaliação Subjetiva Global (ASG).....	64
5- DISCUSSÃO.....	66
6- CONCLUSÃO.....	72
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
8- ANEXOS.....	86
8.1- Índice de atividade da doença de Crohn.....	87
8.2- Aprovações pelo Comitê de Ética.....	88
8.3-Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-Pacientes Grupos DCAT e DCR.....	91
8.4-Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-Grupo Controle (níveis séricos de adipocinas).....	93

8.5-Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-Pacientes Grupo DCG.	94
8.6-Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-Grupo Controle (tecido mesenterial).....	95
8.7-Avaliação Subjetiva Global.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS

Acrp30	Anticorpo anti-adiponectina
APS	<i>Acetate plate sealer</i>
Caco2-BBE	Linhagem de células do intestino
DC	Doença de Crohn
DNBS	Dinitrobenzeno sulfônico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzime-linked immunosorbent assay</i>
ERK	Cinase regulada por sinal extracelular
GP130	Glicoproteína 130
HCL	Ácido clorídrico
IADC	Índice de atividade da doença de Crohn
IKB α	Cinase inibidora do fator nuclear de transcrição KappaB
IL1	Interleucina 1
IL1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
INF γ	Interferon gama
KDa	Kilodalton
NF-KB	Fator nuclear de transcrição KappaB
PBS	Fosfato de sódio dibásico
PSMF	Fenil-metilsulfonilfluoreto
p42	Cinase com isoforma de ERK1

LISTA DE ABREVIATURAS

p44	Cinase com isoforma de ERK2
p50	Subunidade NF-KB
p65	Subunidade NF-KB
RCUI	Retocolite ulcerativa inespecífica
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
rpm	Rotação por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SHP2	Proteína tirosina fosfatase 2
STAT-1	Fator ativador de transcrição e sinalizador de transdução 1
STAT-3	Fator ativador de transcrição e sinalizador de transdução 3
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TMB	Tetrametilbenzidina
TNBS	Trinitrobenzeno sulfônico
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Tris	Hidroximetilamina
Trisma	Hidroximetil amino metano
3T3-L1	Linhagem de adipócito

Quadro 1- Causas da desnutrição protéico-calórica em Doença Inflamatória Intestinal.....	26
Figura 1- Modelo de formação dos complexos de adiponectina.....	30
Figura 2- Redução de I κ B α com aumento da subunidade p65 via NF κ B e liberação de citocinas pró-inflamatórias em linhagem de células do epitélio intestinal.....	32
Figura 3- Redução de citocinas pró-inflamatórias na presença de adiponectina.....	32
Figura 4- Redução da expressão de adiponectina via p44/42.....	33
Figura 5- Aspecto cirúrgico da gordura mesenterial espessada em paciente com doença de Crohn.....	41
Figura 6- Reagentes utilizados para detecção dos níveis de adiponectina por ELISA..	42
Figura 7- Aplicação dos reagentes em placa de 96 poços.....	43
Figura 8- Reagentes utilizados para detecção dos níveis de leptina por ELISA.....	45
Figura 9- Aspecto da placa com a adição da solução de paragem com o ácido clorídrico (em amarelo), após ter sido realizada a incubação com TMB (em azul).....	46
Figura 10- Leitura da placa no espectrofotômetro.....	47
Figura 11- Separação das proteínas por eletroforese com fonte elétrica a 120 volts.....	50
Figura 12- Análise das Bandas auto-radiografadas pelo programa “Gel-Pro Analyzer 3.1”, por meio de densitometria óptica.....	51
Figura 13- Classificação nutricional segundo o IMC.....	52
Figura 14- Determinação da %GC para adultos.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 15- Concentração sérica de adiponectina nos Grupos DCAT, DCR e C.....	56
Figura 16- Concentração sérica de leptina nos Grupos DCAT, DCR e C.....	57
Figura 17- Análise representativa de Imunoblot e determinação da expressão da proteína de adiponectina no tecido adiposo do grupo CG e DCG.....	58
Figura 18- Concentração sérica de PCR nos Grupos DCAT, DCR e C.....	59
Figura 19- Concentração plasmática de colesterol nos Grupos DCAT, DCR e C.....	60
Figura 20- Concentração sérica de triglicérides nos Grupos DCAT, DCR e C.....	61
Figura 21- Concentração sérica de pré-albumina nos Grupos DCAT, DCR e C.....	62
Figura 22- Medida do Índice de massa corporal nos Grupos DCAT, DCR e C.....	63
Figura 23- Medida de gordura corporal (%) nos Grupos DCAT, DCR e C.....	64
Figura 24- Avaliação subjetiva global nos grupos DCAT e DCR.....	65

RESUMO

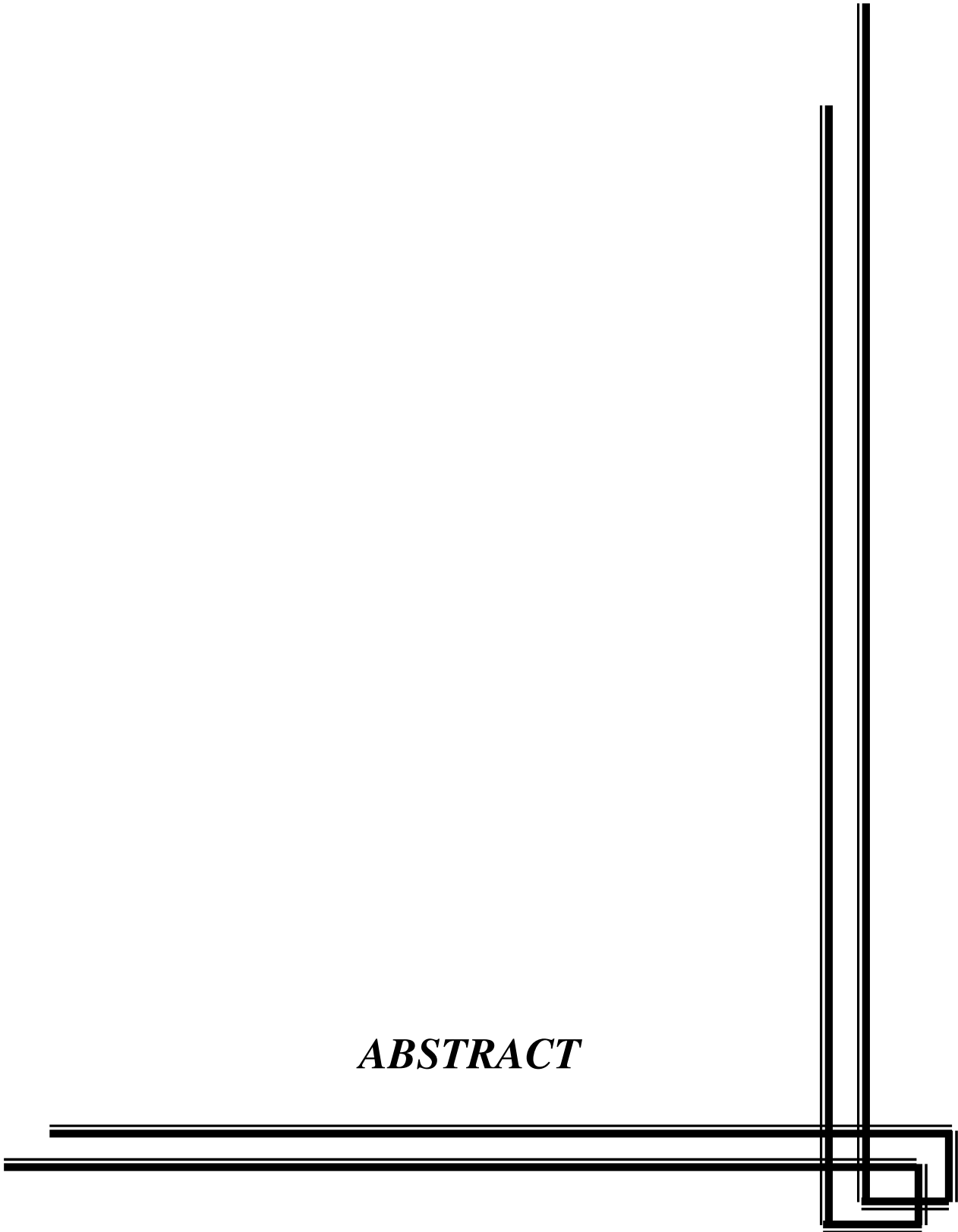
A doença de Crohn (DC) é caracterizada por uma inflamação de etiologia ainda desconhecida. A hipertrofia do tecido adiposo mesentérico reflete a atividade da doença, uma vez que o mesmo recobre toda a área acometida pela doença. Além disso, os adipócitos sintetizam leptina e adiponectina, adipocinas com ações pró e antiinflamatórias.

Objetivo: Avaliar as concentrações séricas de leptina e adiponectina na DC em remissão e em atividade, como também a expressão tecidual de adiponectina na DC em atividade.

Casuística e Método: Dezesesseis pacientes com DC ileocecal atendidos no ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais da Universidade Estadual de Campinas participaram do estudo. A análise de leptina e adiponectina foi realizada por ELISA nos pacientes com DC em atividade (grupo DCAT), DC em remissão (grupo DCR) e seis controles saudáveis. Também dez pacientes com DC ileocecal em atividade (grupo DCG) e oito controles (grupo CG) com doença não inflamatória participaram do estudo, para avaliação da adiponectina tecidual. As biópsias foram armazenadas em nitrogênio líquido, e a expressão de adiponectina foi realizada por imunoblot de extrato protéico total. Resultados: Os níveis de proteína C reativa foram maiores no grupo DCAT quando comparado aos demais grupos ($p < 0,05$). Os níveis séricos de adiponectina foram menores no grupo DCAT comparado ao controle, porém não houve diferença entre os grupos DCAT e DCR. A expressão de adiponectina no tecido mesentérico foi significativamente menor no grupo DCG quando comparado ao controle (grupo CG). A leptina sérica foi similar entre os grupos ($p > 0,05$). Os níveis de colesterol total e pré-albumina foram menores no grupo DCAT ($p < 0,05$), quando comparados com o controle. O índice de massa corporal e o nível sérico de triglicérides foram similares entre os grupos. A % de gordura corporal foi menor no grupo DCAT em relação ao controle, e a avaliação subjetiva global mostrou desnutrição no grupo

DCAT quando comparado ao DCR. Conclusão: Baixos níveis de adiponectina sérica e mesenterial na DCAT sugerem defeito nos mecanismos antiinflamatórios, o que pode ser responsável pela manutenção do processo inflamatório e hipertrofia da gordura mesenterial próximo à área intestinal afetada, mesmo na presença de baixos níveis de % de gordura corporal.

ABSTRACT



Crohn's disease (CD) is characterized by inflammation and an etiology that is still unknown. Hypertrophy of mesenteric fat is a reflect of disease activity, since this fat covers the entire length of the affected area. Also, adipocytes synthesize leptin and adiponectin, adipokines responsible for pro and anti-inflammatory effects. Aim: To evaluate serum levels of adiponectin and leptin, as well as mesenteric expression of adiponectin in active CD and those in remission. Casuistic and Methods: Sixteen patients with ileocecal CD followed at the Outpatient Clinic, Coloproctology Unit of University of Campinas Clinical Hospital, participated of the study. Analysis of serum adiponectin and leptin by enzyme linked immunosorbent assay were performed in patients with active CD (DCAT Group), remission CD (DCR Group) and in six healthy controls. Ten patients with active ileocecal CD (DCG Group) and eight patients (CG Group) with non-inflammatory disease selected for surgery were also studied. The specimens were snap-frozen and the expression of adiponectin was determined by immunoblot of protein extracts. Results: Serum C-reactive protein levels were higher in DCAT Group when compared to the others ($p < 0.05$). Serum adiponectin was lower in the DCAT Group when compared to control ($p < 0.05$), but no differences were seen when comparing the DCAT and DCR Groups. Mesenteric adiponectin expression was lower in DCG group when compared to CG group ($p < 0.05$). Serum leptin was similar in all groups ($p > 0.05$). Serum total cholesterol and pre-albumin were lower in the DCAT group when compared to controls ($p < 0.05$). Body Mass Index (BMI) and serum triglycerides were similar among the groups. The percentage of body fat was lower in the DCAT group compared to controls, and the global subjective evaluation showed malnourishing in the DCAT group when compared to DCR group. Conclusion: The lower level of serum and mesenteric adiponectin in active CD suggests a defective regulation of anti-inflammatory pathways, which could be responsible to the maintenance

of inflammatory process and hypertrophy of the mesenteric fat tissue nearby the affected intestinal area, even in the presence of low percentage of body fat.

1-INTRODUÇÃO

1.1 - Considerações Gerais

A afecção hoje denominada como doença de Crohn (DC) foi descoberta em 1932 por Burril Bernard Crohn gastroenterologista clínico que marcou a história com a publicação da descrição dos primeiros casos de “ileíte terminal” (nome denominado na época para DC)¹. Contudo, existem relatos sobre a doença desde a Grécia Antiga e Alexandria quando era equivocadamente confundida com enterocolites decorrente de doenças parasitárias. Soranus de Éfeso (170 d.C) descreveu em seu livro uma afecção similar à DC².

A DC é caracterizada por uma inflamação transmural que pode acometer qualquer porção do trato gastrointestinal, sendo mais comum o comprometimento do íleo e do cólon, com lesões descontínuas resultando em dor abdominal, diarreia com sangue e/ou muco³, desnutrição e sangramento intestinal^{4,5}. A inflamação transmural pode ser evidenciada pela presença de hiperplasia linfóide, edema submucoso e lesão ulcerada⁶.

A doença com localização em íleo terminal atinge 47% dos casos, 28% no cólon, 21% na região íleocolônica e 3% em trato gastrointestinal superior⁷. A etiologia da DC ainda é desconhecida, mas a identificação e o diagnóstico podem ser realizados mediante avaliação clínica, histológica e endoscópica⁸.

A doença cursa com crises intermitentes, alternadas com fase de remissão de duração indefinida ou com forma ativa progressiva contínua³. Ambas as fases ativa e de remissão, podem ser caracterizadas por meio do Índice de Atividade da Doença de Crohn (IADC) que avalia perda de peso, massa abdominal, dor abdominal, número de evacuações, uso de antidiarréico, sinais/sintomas associados e alteração de hematócrito, classificando a doença em: remissão, atividade leve, moderada ou grave⁹ (Anexo 8.1).

As manifestações extraintestinais acometem 25% dos pacientes com DC como exemplo são as: enteroartropatias, uveítes, pioderma gangrenoso, e colangite esclerosante, comumente encontradas na DC colônica³.

1.1.2 - Aspectos nutricionais na doença de Crohn

Yamamoto e colaboradores (2009) citam que a desnutrição proteico-calórica é caracterizada por um estado patológico definido como ingestão inadequada de proteína e energia¹⁰. A desnutrição em pacientes com DC está diretamente relacionada com a atividade da doença, extensão e localização da inflamação, e acometimento do intestino delgado resultando em maior deficiência nutricional quando comparado à doença colônica¹¹.

A diminuição da ingestão dietética pode ocorrer devido a obstrução intestinal, presença de fístulas, extensa inflamação intestinal, além de má absorção de gordura após ressecção de íleo terminal por deficiência de sais biliares¹¹, interação droga-nutriente¹² e aumento do requerimento energético^{12,13,11} (Quadro 1). A redução da ingestão dietética é a principal causa de desnutrição, conseqüentemente os pacientes reduzem o consumo devido ao medo de apresentarem dor abdominal ou diarreia¹¹.

A desnutrição protéico-energética comum na DC, possui uma incidência de 25 a 80%¹⁴ sendo decorrente de uma resposta inflamatória sistêmica. As citocinas pró-inflamatórias interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interferon-gama (IFN- γ) são as principais estimuladoras da produção de proteínas de fase aguda, uma vez presente no sistema nervoso em níveis elevados, o TNF- α induz a anorexia, enquanto que nos tecidos periféricos, há predomínio do catabolismo protéico, e redução da ingestão alimentar em 60 a 100% da necessidade energética^{14,15}.

A anorexia e a desnutrição alteram a composição corporal do tecido adiposo branco intra-abdominal, principalmente na DC, comprometendo a expressão de proteínas secretadas pelos adipócitos¹⁶.

Segundo Geerling e colaboradores (1998), a dificuldade de avaliação nutricional na DC é decorrente da complexa alteração da composição corpórea individual, resposta de cada paciente, complexidade da doença, e de situações de estresse e ingestão alimentar¹⁷.

Diminuição da ingestão oral	<ul style="list-style-type: none"> - Dieta restritiva, jejum terapêutico - Pela própria doença: dor abdominal, diarreia, náusea e vômito etc - Alteração no paladar: devido a drogas, deficiência de vitaminas e minerais, mediadores pró inflamatórios
Perdas gastrointestinais	<ul style="list-style-type: none"> - Diarreia - Hematoquezia - Perda de muco e eletrólito - Enteropatia perdedora de proteína
Distúrbios metabólicos	<ul style="list-style-type: none"> - Aumento do gasto energético de repouso - Aumento da oxidação de gordura
Aumento no requerimento nutricional no estado inflamatório	<ul style="list-style-type: none"> - Aumento oxidativo do metabolismo basal - Complicação infecciosa - Pós-operatório
Interação medicamentosa	<ul style="list-style-type: none"> - Corticóide e reabsorção de cálcio - Corticóide e catabolismo protéico - Metotrexato e folato - Vitaminas lipossolúveis e colestiramina - Antimicrobianos e vitamina K - Anti-secretóres e ferro
Má absorção de nutrientes	<ul style="list-style-type: none"> - Redução da superfície de absorção: ressecção intestinal, fístulas entéricas, hipertrofia das vilosidades - Alça cega, supercrescimento bacteriano - Má absorção de sais biliares em ileíte ou ressecção

Quadro 1. Causas da desnutrição protéico-calórica em Doença Inflamatória Intestinal. Fonte: García-Manzanares et al. (2006) adaptado por Lucendo e De Rezende (2009).

1.1.3 - Tecido Adiposo Mesenterial na DC

Apesar de haver variação fenotípica entre os doentes de Crohn, são comuns alguns aspectos macroscópicos, principalmente no que se refere ao espessamento da gordura mesenterial próxima à área afetada. A análise histológica revela anormalidades neste tecido adiposo, incluindo infiltrado de macrófagos e de células T, fibrose e inflamação perivascular, além do aumento do número de adipócitos, quatro vezes maior na DC comparados aos controles, sendo estas células de pequeno tamanho¹⁸.

Constitui característica comum na DC a hipertrofia do tecido adiposo mesentérico que passa a recobrir parcialmente a circunferência intestinal com um envoltório de gordura, podendo acometer o intestino delgado e grosso⁸. Leal e colaboradores (2012), demonstraram que a redução da autofagia no tecido adiposo mesenterial de pacientes com DC pode ser um fator na manutenção da resposta inflamatória¹⁹.

Embora o acúmulo de gordura intra-abdominal esteja diretamente envolvido no desenvolvimento de desordens metabólicas, como: diabetes mellitus tipo 2 e doença arterial coronariana, na DC a presença de gordura mesentérica hipertrofiada próxima à área intestinal acometida pela doença se faz presente independente do índice de massa corporal ou da presença de desordens metabólicas²⁰. Contudo, alterações decorrentes da inflamação do tecido adiposo de obesos são similares as alterações que ocorrem na DC^{21,22}. É discutível se a hipertrofia do tecido adiposo neste caso pode ser entendida como uma barreira ao processo inflamatório⁸ ou um fator que o mantém, resultando no aspecto transmural característico da DC.

O tecido adiposo branco apresenta estruturas metabólicas que possibilitam a conexão com outros tecidos e órgãos distantes. Além de participar do metabolismo energético, função neuroendócrina e imune²³.

O tecido adiposo compreende de 20-25% do peso corporal²⁴ e é considerado uma fonte de moléculas bioativas com ação local e /ou sistêmica, chamada adipocitocinas^{16,25}. O termo adipocitocina inicialmente introduzido por Funahashi et al.1999 refere que as proteínas produzidas nos adipócitos são somente citocinas²⁶. Atualmente, um grupo contendo mais de 50 moléculas são secretadas nos adipócitos, desta forma, estas proteínas que não pertencem à um grupo específico, são chamadas de adipocinas²⁷.

Diferentes estruturas celulares compõem este tecido: adipócitos, pré-adipócitos, células endoteliais, fibroblastos, macrófagos e leucócitos^{24,28}. Em indivíduos normais estas estruturas são capazes de sintetizar várias citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias, adipocitocinas²⁹, além de poderem expressar *Toll-like receptor 4* (TLR4) para o reconhecimento de antígenos bacterianos locais ou mesmo sistêmicos^{30,31,32}.

Os adipócitos são as células que predominam no tecido adiposo, sendo 95% de seu volume composto de uma única organela central com vacúolo preenchido com gotículas de triglicerídeos. Os outros 5% do volume, como citoplasma, é metabolicamente ativo, produzindo diferentes adipocinas. Adiponectina e leptina são exemplos de adipocinas sintetizadas pelos adipócitos e objetos do presente estudo, porém outras adipocinas estão localizadas na matriz do tecido adiposo como: resistina, grelina e visfatina^{24,28}.

1.2 - Revisão da Literatura

1.2.1 - Adipocinas: adiponectina e leptina

Scherer et al. identificou em 1995 a adiponectina pela codificação do cDNA de preadipócito³³, caracterizando uma proteína com 244 aminoácidos³⁴ e com peso molecular de 30-KDa³³.

A adiponectina apresenta três formas: monomérica, trimérica e oligomérica. A forma monomérica contém domínio globular e domínio de colágeno, e não foi observada esta forma na corrente sanguínea restringindo-se apenas ao adipócito. A formação básica da adiponectina é realizada pela forte associação de um trímero (junção de três monômeros pelo domínio globular)³⁵ (Figura 1).

Os oligômeros são formados por 4-6 trímeros pela junção do domínio de colágeno que são estruturas mais complexas e que circulam no plasma. Sem o domínio de colágeno, o domínio globular da adiponectina trimeriza, mas não se associa com as estruturas complexas. Estes domínios são importantes, pois conferem estabilidade e atividade das formas multiméricas³⁵ (Figura 1).

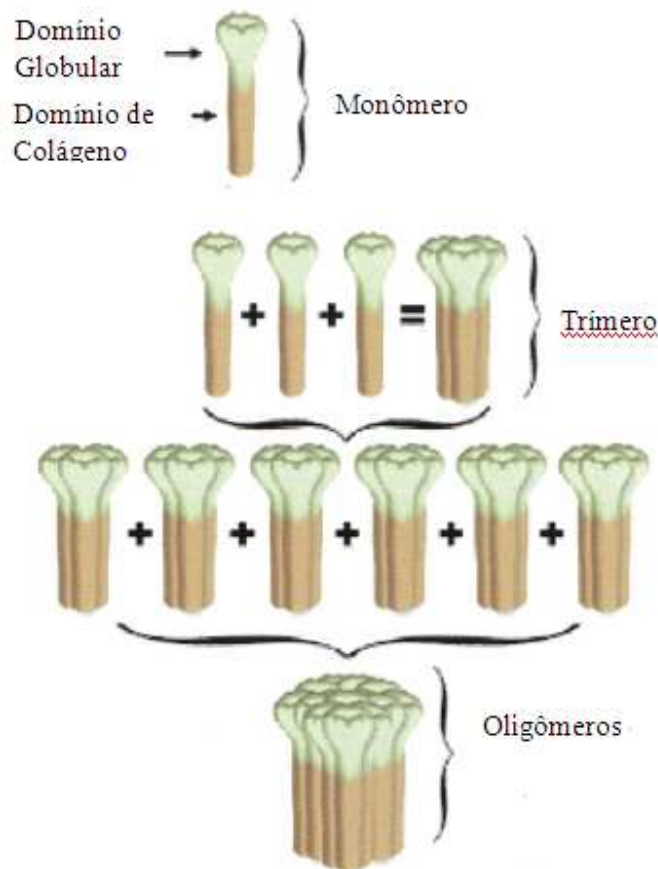


Figura 1. Modelo de formação dos complexos de adiponectina. Fonte: adaptado de Chandran et al (2003).

Alguns efeitos são conferidos à adiponectina como: aumento da sensibilidade à insulina, prevenção da aterosclerose, e de fibrose^{8,36}. Este adipormônio possui papel primordial no metabolismo de lipídeo e de glicose em humanos e animais sensíveis a insulina, e em ambos, os estudos evidenciaram diminuição nos níveis de adiponectina diretamente proporcional a resistência à insulina^{35,37}.

Diferentemente dos outros hormônios do tecido adiposo, seus níveis séricos diminuem à medida que aumenta a adiposidade e são inversamente correlacionados com a obesidade^{8,36}.

A leptina, outra importante adipocina, da raiz grega *leptos* significa magro³⁸ é um peptídeo com 16-KDa descoberto em 1994 por Zhang e colaboradores por meio da técnica de clonagem posicional, onde foi observado que um gene do camundongo ob/ob apresentava uma mutação que conferia a estes animais total deficiência do gene³⁹.

Esta adipocina com 167 aminoácidos³⁹ produzida primariamente no tecido adiposo³⁴, pode ser secretada também no estômago, músculo, glândula pituitária e placenta^{40,41,42} conferindo função endócrina adicional³⁴.

Os níveis circulantes de leptina dependem da quantidade de depósito de gordura, sendo mais abundante no tecido adiposo subcutâneo comparado ao visceral²³.

A leptina desempenha funções fisiológicas tais como: regulação de apetite, gasto energético, maturação sexual e fertilidade, hematopoiese e metabolismo ósseo, mediante atividade hipotalâmica³⁴. Este hormônio transmite para o cérebro a informação de armazenamento de energia periférica, desta forma este hormônio é capaz de regular a

atividade neuronal em várias regiões do hipotálamo, induzindo perda de peso por meio da inibição de apetite e estímulo do gasto energético⁴³.

A leptina possui função de regulação do sistema imunológico, estimulando o recrutamento de células T,^{44,45} e em indivíduos desnutridos a leptina estaria reduzida ocasionando maior susceptibilidade à infecção⁴⁶. Segundo Barbier e col. (2005), a leptina aumenta a secreção de TNF- α e de IL-6, citocinas pró-inflamatórias envolvidas na patogênese da DC⁴⁷. Em um estudo envolvendo modelos experimentais com inflamação intestinal induzida por ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), mostrou aumento sérico de leptina⁴⁸.

1.2.2 - Vias celulares envolvidas com adiponectina e leptina

O fator nuclear Kappa-B (NF-kB) consiste de 2 subunidades de proteínas p50 e p65, quando estimulado conduz ao aumento de genes relacionados com respostas imunológicas e inflamatórias. O NF-kB está presente no citoplasma da célula e mantido neste espaço pela cinase inibidora do fator de transcrição (I κ B α) impedindo sua entrada no núcleo da célula⁴⁹.

O estímulo com leptina em linhagem de células do epitélio intestinal (Caco2-BBE) foi capaz de ativar o NF-kB, envolvido na transdução de sinal que resulta na transcrição de diversas citocinas pró-inflamatórias, via redução de I κ B α . A ação da leptina nestas células resulta em uma ação pró-inflamatória conduzindo a inflamação para áreas não inflamadas⁵⁰ (Figura 2).

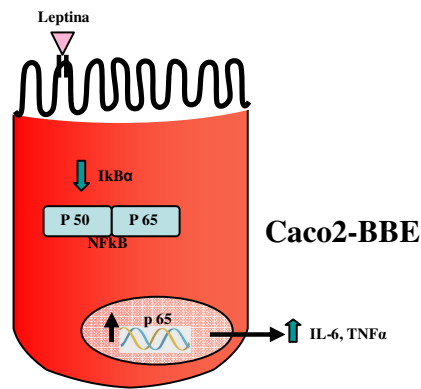


Figura 2. Redução de IκBα com aumento da subunidade p65 via NFκB e liberação de citocinas pró-inflamatórias em linhagem de células do epitélio intestinal.

Estudos com adiponectina demonstraram efeitos contrários, no primeiro, camundongos “knockout” de adiponectina mostraram maiores níveis de TNF-α e IL-6 em cultura de adipócito e fração estromal comparado ao camundongo selvagem. Contudo camundongos transgênicos que superexpressam adiponectina, as expressões de TNF-α e IL-6 apresentaram menor atividade quando comparado ao camundongo selvagem⁵¹. Na presença de adiponectina ocorre aumento de IκBα mantendo NFκB retido no citoplasma e conseqüentemente não ocorre, no núcleo, a transcrição de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias (Figura 3).

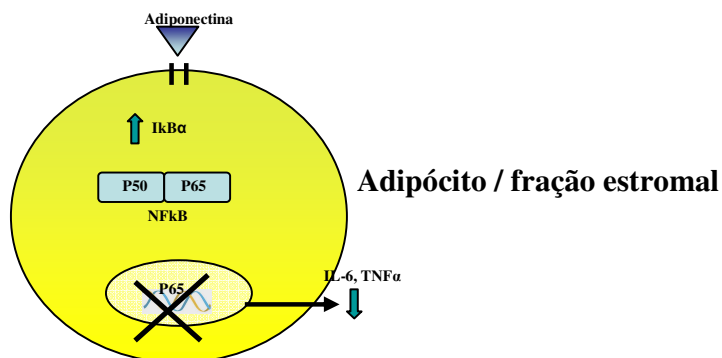


Figura 3. Redução de citocinas pró-inflamatórias na presença de adiponectina.

As proteínas p42 e p44 são cinases também chamadas pela isoforma de ERK1 e ERK2, capazes de modular a atividade de vários substratos como: fatores de transcrição, proteínas de membrana e outras proteínas cinases⁵², em todos os compartimentos da célula⁵³.

No segundo estudo em célula linhagem de adipócito (3T3-L1) tratada com IL-6, mostrou que a expressão do gene de adiponectina está reduzida via p44/42. Quando IL-6 se liga ao seu receptor, se fosforila, e ativa o fator ativador de transcrição e sinalizador de transdução 1 e 3 (STAT 1/3), bem como proteína tirosina fosfatase (SHP2) que se ligam à glicoproteína 130 (gp130) e ativa p44/42 cinase resultando na diminuição da expressão da adiponectina. Quando inibida a proteína p44/42, a expressão da adiponectina retorna aos níveis anteriores, porém de forma parcial⁵⁴ (Figura 4).

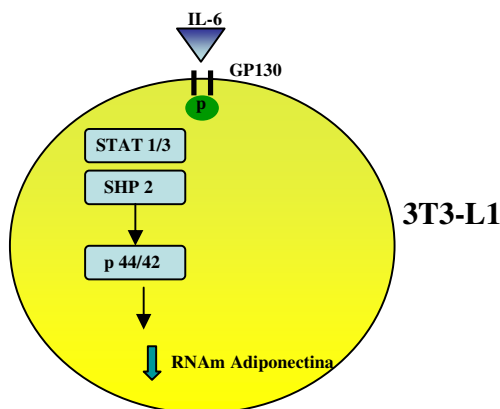


Figura 4. Redução da expressão de adiponectina via p44/42.

1.2.3 – Outras Adipocinas na doença de Crohn

A resistina é um hormônio com peso molecular de 12,5 KDa, e está envolvida em processos metabólicos e inflamatórios em estudos com humanos¹⁶. Segundo Karmiris et al.

(2006) os níveis séricos de resistina em DC são maiores do que o controle¹⁶. Em outro estudo a resistina apresentou níveis elevados no tecido adiposo mesentérico de pacientes com DC quando comparado com controle (diverticulite ou câncer de cólon)²⁵.

Apesar da grelina ser um hormônio produzido no estômago, ela também é expressa no tecido adiposo em pequenas quantidades. Possui a função de modular resposta imune e processos inflamatórios⁵⁵ além de regular a ingestão alimentar e a homeostase de energia¹⁶.

Os níveis séricos de grelina estão aumentados nos pacientes com DC quando comparado com o controle, sendo maior em homens do que em mulheres e este aumento foi maior na DC de íleo quando comparada com DC de cólon, apresentando correlação com baixos níveis de leptina quando comparado ao controle¹⁶.

Segundo Peracchi et al. (2006) os níveis de grelina também foram maiores em pacientes com DC ativa, quando comparados com controle e com DC em remissão, observando controle do processo inflamatório. Alguns mediadores inflamatórios presentes na DC podem incentivar a liberação deste hormônio em tecidos gastrointestinal ou extraintestinal, como células do sistema imunológico⁵⁵.

A visfatina é produzida e secretada no tecido adiposo visceral⁴⁶, participando na diferenciação de linfócitos B levando a produção de citocinas pró-inflamatórias^{56,57}. No estudo com pacientes com DC e Retocolite Ulcerativa Inespecífica (RCUI) em atividade a visfatina estava aumentada quando comparada ao controle⁵⁸. Moschen et al. (2007) demonstraram que os níveis séricos de visfatina estão aumentados em pacientes com DC e RCUI, e a expressão de RNAm (ácido ribonucléico mensageiro) tecidual em ambas doenças também está aumentada quando comparada ao controle⁵⁶.

Considerando as funções exercidas pela adiponectina e leptina, existem poucos estudos na literatura avaliando os níveis séricos e teciduais de adipocinas na DC. De

maneira similar, o perfil nutricional da DC caracterizado pela relação paradoxal de uma desnutrição protéico-energética concomitante à hipertrofia do tecido adiposo mesenterial tem recebido pouca atenção. O estudo das adipocinas nesse contexto possibilita o entendimento de fatores relacionados à fisiopatologia da DC, uma vez que se investiga o papel do tecido adiposo no processo inflamatório transmural presente na alça intestinal.

2- OBJETIVOS

2 - Objetivos

Geral

Avaliar a concentração de adiponectina e leptina nos pacientes com doença de Crohn em remissão e em atividade.

Específicos

- ✓ Avaliar os níveis séricos de adiponectina e leptina de pacientes com doença de Crohn em remissão e em atividade.

- ✓ Avaliar a expressão da adiponectina no tecido adiposo mesenterial em pacientes com doença de Crohn em atividade.

- ✓ Avaliar o estado nutricional de pacientes com doença de Crohn em remissão e em atividade.

3- CASUÍSTICA E MÉTODO

3.1 – Casuística

Dezesseis pacientes com DC ileocecal atendidos no Ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais do Serviço de Coloproctologia do Hospital de Clínicas – UNICAMP, foram estudados e coletadas amostras de sangue venoso, sendo oito com DC em atividade (DCAT) e oito com DC em remissão (DCR). O grupo controle (C) foi constituído por seis indivíduos sadios.

Os grupos não diferiram com relação ao gênero, e a média de idade foi de 33,6 (16 - 49) anos para os doentes com DCAT, 37,3 (24 - 53) anos para aqueles com DCR e 31,3 (25 - 48) anos para o grupo C ($p>0,05$). O tempo médio de doença foi de 84,8 (8 - 192) meses para o grupo DCAT e de 112,5 (24 - 204) meses para o grupo DCR ($p>0,05$).

A atividade da doença foi classificada mediante exames de colonoscopia, radiografia de trânsito intestinal, anátomo-patológico e IADC⁹. A média do IADC foi de 383,8 (283,7 – 500,8) nos doentes com DC em atividade evidenciando uma atividade moderada da doença, enquanto que os portadores de DC em remissão apresentaram média de 82 (21,4 – 141,4) ($p<0,0001$). Com relação ao peso corporal não houve diferença entre os grupos apresentando média de 55,3 (36,8 – 70)Kg os pacientes DCAT, 58,6 (54 -70) Kg no grupo DCR e o grupo C ($p>0,05$).

Outro grupo de pacientes com DC ileocecal atendidos no Ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais do Serviço de Coloproctologia do Hospital de Clínicas – UNICAMP, foram selecionados constituindo 10 pacientes com DC em atividade que foram submetidos ao procedimento cirúrgico, sendo realizada coleta de amostra do tecido adiposo mesenterial próximo ao íleo (grupo DCG). Este grupo apresentava-se com média de idade de 34,9 (14-60) anos, sendo 50% do gênero masculino. A presença da atividade da doença foi avaliada mediante realização de colonoscopia antes da cirurgia e IADC maior que 250

pontos. O grupo controle foi constituído por oito pacientes com indicação cirúrgica de retossigmoidectomia por doença não inflamatória (megacólon chagásico ou idiopático), com íleo distal normal (grupo CG). A média de idade dos indivíduos do grupo controle foi de 55,6 (39-70) anos, sendo 62,5% do sexo masculino.

3.1.1 - Fatores de Exclusão

Foram excluídos do estudo, pacientes com outras doenças no trato digestório, ostomizados, portadores de DC perineal e pacientes com outras doenças inflamatórias.

3.1.2 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, registrado sob nº 356/2009 e nº 287/2010 (Anexo 8.2). Todos os participantes assinaram o termo de consentimento informado (Anexos 8.3, 8.4, 8.5 e 8.6).

3.2 - Método

A análise dos níveis séricos de adiponectina e leptina dos grupos DCAT, DCR e controle foram realizadas a partir de amostras de sangue venoso e mensuradas por meio do método de *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). A expressão de adiponectina nos grupos DCG e CG foi realizada a partir das amostras teciduais obtidas durante procedimento cirúrgico e avaliadas por meio de imunoblot de extrato protéico total. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Gastroenterologia Experimental do Gastrocentro e no Laboratório de Sinalização Celular FCM, UNICAMP.

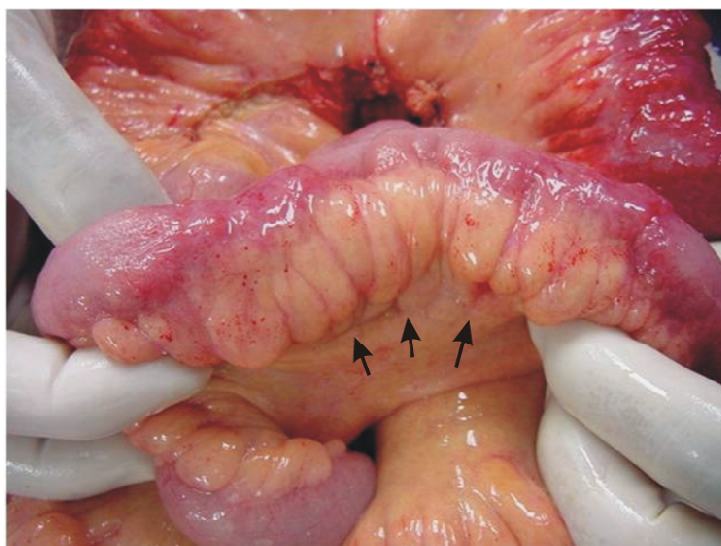


Figura 5: Aspecto cirúrgico da gordura mesenterial espessada em paciente com doença de Crohn.

3.2.1 - Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Expressão de Adiponectina e Leptina séricas

A determinação da concentração de adiponectina e leptina foi realizada por meio de um ensaio competitivo para dosagem sérica quantitativa. A amostra de sangue total, obtida da coleta dos grupos C, DCR e DCAT foi centrifugada por 10 min, para separação do soro. Cerca de 3mL de soro foram armazenados em microtubo cônico, em biofreezer a -80°C , até que fossem realizadas as determinações das citocinas.

Todo o procedimento foi realizado seguindo as instruções do fabricante Phoenix (CA, USA) para determinação de adiponectina e Abcam (Cambridge, USA) para leptina.

Os resultados obtidos foram comparados a uma curva padrão, utilizando amostra de concentração conhecida de adiponectina e leptina.

Preparação dos reagentes para dosagem de Adiponectina

- Solução Tampão: A solução tampão foi preparada, diluindo-se a solução estoque 20x em água destilada. Os cristais formados durante a diluição, foram completamente dissolvidos após a solução ter sido mantida em banho a 37°C por aproximadamente 30 minutos. Após a preparação, a solução foi estocada a 4°C até o momento de uso.
- Biotinilado: O anticorpo biotinilado liofilizado foi reidratado com 100µl de solução tampão na diluição de 1:750.
- Streptoavidina: A solução de streptoavidina foi centrifugada por 5 segundos e diluída em solução tampão na proporção de 1:2000. Controle Positivo: O frasco contendo o controle positivo liofilizado foi centrifugado e o conteúdo reidratado com 250µl de solução tampão.
- TMB (tetrametilbenzidina), HCl (ácido clorídrico) e APS (*acetate plate sealer*) foram fornecidos pelo fabricante na forma de soluções prontas para uso. Todas as soluções foram centrifugadas antes do uso.



Figura 6: Reagentes utilizados para detecção dos níveis de adiponectina por ELISA.

Preparação do padrão de Adiponectina

- O padrão de Adiponectina foi reidratado com 1mL de solução tampão, a fim de se obter uma solução com concentração equivalente a 100ng/mL.

Método de Elisa para determinação de Adiponectina

Inicialmente, a placa onde o ensaio foi realizado foi lavada com 300µl de solução tampão por 5 minutos. Em seguida, o excesso de solução foi descartado, tomando o cuidado para não secar a placa completamente. Em poços distintos foram adicionados 100µl da solução padrão de adiponectina e 100µl do controle positivo, ambos em triplicata. No restante dos poços, foram adicionados 100µl de soro dos diferentes grupos, diluídos em solução tampão na proporção de 1:1000.

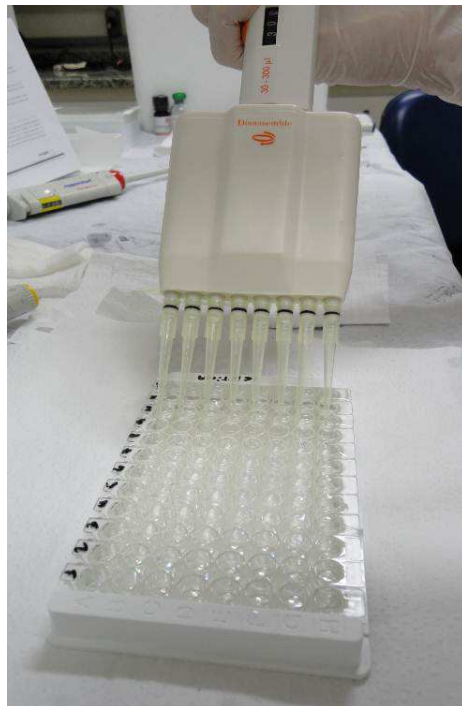


Figura 7: Aplicação dos reagentes em placa de 96 poços.

A solução de APS foi centrifugado a 300-400 rpm, acrescentado na placa e incubado por 2 horas à temperatura de 20-23°C. Após este período, o APS foi removido e a placa foi lavada quatro vezes com 300- 350µl de solução tampão.

Em seguida, 100µl de anticorpo secundário biotilado foi adicionado à placa e incubado por 2 horas. Após esse período, a solução foi descartada e a placa foi lavada quatro vezes com solução tampão.

Novamente 100µl de streptoavidina foi adicionada à placa, incubada por 30 minutos, removida após o período de incubação, seguida de lavagem da placa com solução tampão por quatro vezes.

Ao final do procedimento experimental, 100µl do substrato de cor azul TMB foi adicionado e a placa incubada no escuro por 30 minutos. Após incubação, 100µl da solução de HCL foi adicionada à placa contendo o TMB, alterando a cor da solução para amarelo. A intensidade de cor foi determinada dentro de 20 minutos por espectrofotometria a 450nm.

Preparação do reagente para determinação de Leptina

- Diluente B: O diluente B foi preparado diluindo-se a solução 5x em água destilada.
- Solução de lavagem: 20 ml de solução de lavagem foram diluídas em 380mL de água destilada. Os cristais formados foram totalmente dissolvidos à temperatura ambiente.
- Anticorpo Secundário Biotilado: A solução de anticorpo foi preparada diluindo-se 80x no diluente B (1x).

- Streptoavidina: A solução de streptoavidina foi diluída 8000x em diluente B (1x).
- Solução padrão: A solução foi preparada adicionando-se 800 μ l do diluente A no item C afim de se obter a concentração de 110ng/mL de padrão. Foi adicionado 2 μ l do padrão de leptina no item C no fraco com 548 μ l de diluente A e preparado um estoque de solução padrão na concentração 400pg/mL.



Figura 8: Reagentes utilizados para detecção dos níveis de leptina por ELISA.

Método Elisa para Leptina

Inicialmente 100 μ l de soro dos diferentes grupos foram adicionados à placa, em triplicata, e incubados por 2 horas e 30 minutos sob baixa agitação, à temperatura ambiente. Após a incubação, a solução foi descartada, todo o líquido foi removido e a placa foi lavada quatro vezes com 300 μ l de solução de lavagem.

Em seguida, 100 μ l de anticorpo secundário biotilado foi adicionado à placa e incubado por 1 hora. Após esse período, a solução foi descartada e a placa foi lavada quatro vezes com solução tampão.

Novamente 100 μ l de streptoavidina foi adicionada à placa, incubada por 45 minutos, removida após o período de incubação, seguida de lavagem da placa com solução tampão por quatro vezes.

Ao final do procedimento experimental, 100µl do substrato de cor azul TMB foi adicionado e a placa incubada no escuro por 30 minutos. Após incubação, 100µl da solução de parada (stop solution) foi adicionada à placa contendo o TMB, alterando a cor da solução para amarelo. A intensidade de cor foi determinada imediatamente por espectrofotometria a 450nm.



Figura 9: Aspecto da placa com a adição da solução de paragem com ácido clorídrico (em amarelo), após ter sido realizada a incubação com TMB (em azul).



Figura 10: Leitura da placa no espectrofotômetro.

3.2.2 – Imunoblot

- Reagentes, materiais e equipamentos

Os reagentes e aparelhos para realização de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foram adquiridos da Bio-Rad (Richmond, CA). Metano hidroximetilamina (TRIS), fenil-metilsufonilfluoreto (PSMF), aprotinina e ditioneitol (DTT), Triton X-100, Tween 20, e glicerol foram fornecidos pela Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA). A membrana de nitrocelulose (BA85, 0.2 μ m) e a proteína A Sepharose 6 MB foram obtidas da Amersham (Aylesbury, UK). O anticorpo específico anti-adiponectina (ACRP30, sc-17044, goat polyclonal) foi obtido da Santa Cruz Biotechnology (CA, USA). O marcador de peso molecular utilizado foi o PageRuler™ da Fermentas (MD, USA). Os reagentes para a reação de quimioluminescência foram da SuperSignal® (Rockford). A albumina 5% utilizada é de origem bovina.

- Os reagentes e soluções utilizados foram:

1. Tampão de extração: utilizado para a extração das proteínas celulares dos tecidos estudados, contém: Trisma base pH 7,5 (hidroximetil amino metano) 100mM, SDS (dodecil sulfato de sódio) 10%, EDTA (Ácido etileno-diamino tetracético) 10mM, fluoreto de sódio 100mM, pirofosfato de sódio 10mM, ortovanadato de sódio 10mM. O ortovanadato foi colocado no momento de utilização do tampão.

2. Tampão de Laemmli (5X): usado para estocar o material extraído e sua posterior aplicação no gel de poliacrilamida para eletroforese (SDS-PAGE). Contém: azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 10%.

3. Solução tampão utilizada na eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Contém: Trisma base 200mM, glicina 1,52M, EDTA 7,18mM e SDS 0,4%. Para uso, a solução é diluída 1:4.

4. Solução tampão para transferência: empregada para a transferência das proteínas separadas no SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose. Contém: Trisma base 25mM, glicina 192 mM, Metanol 20% e SDS 0,02% para facilitar a diluição de proteínas de alto peso molecular. Mantida estocada a 4^oC.

5. Solução tampão para SDS-PAGE – Gel de resolução (resolving): tampão composto de EDTA 4mM, SDS 2%, Trisma base 750 mM, com pH ajustado para 8,9 com ácido clorídrico.

6. Solução tampão para SDS-PAGE – Gel da fase de empilhamento (stacking) das proteínas. Contém: EDTA 4 mM, SDS 2%, Trisma base 50mM, com pH ajustado para 6,7 com ácido fosfórico.

7. Solução basal: solução básica utilizada para o manuseio da membrana de nitrocelulose após transferência das proteínas. Contém: Cloreto de sódio 150 mM, Trisma base 10 mM, Tween 20 0,02%.

8. Solução bloqueadora: albumina 5% e azida sódica 0,02%, dissolvidos em solução basal ou solução com 5% de leite em pó desnatado e azida sódica 0,02%, dissolvidos em solução basal.

9. Solução para anticorpos: solução contendo anticorpos específicos que identificam as proteínas transferidas para a membrana de nitrocelulose. Contém 3% de leite em pó desnatado e azida sódica 0,02%, diluídos em solução basal.

- Imunoblot

Fragments do tecido adiposo mesenterial coletados durante procedimento cirúrgico foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas à -80°C em freezer para posterior homogeneização em tampão contendo 1% de Triton X 100, 100mM de Tris (pH 7,4), 100mM de pirofosfato de sódio, 100mM de fluoreto de sódio, 10mM de EDTA, 10mM de vanadato de sódio, 2mM de PMSF e 0,1mg/ml de aprotinina a 4°C , com Polytron PTA 20S em velocidade máxima por 30 segundos (modelo PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY).

O homogeneizado foi então centrifugado a 11.000 rpm por 20 minutos a 4°C . No sobrenadante foi determinada a concentração de proteína utilizando o método de Bradford⁵⁹ e posteriormente preparou-se amostra contendo 50 μg de proteína total para ser utilizado nos experimentos de immunoblot e separação por SDS-PAGE. As amostras foram diluídas em tampão de Laemmli, contendo 100mmol/L de DTT. Após rápida fervura, foram aplicadas em gel de poliacrilamida para separação por eletroforese (SDS-PAGE). As proteínas separadas em SDS-PAGE foram transferidas para membranas de nitrocelulose, em aparelho de transferência da BIO-RAD[®]. As membranas de nitrocelulose foram incubadas “overnight” com anticorpo específico (anti-adiponectina) na proporção de 1:100. A ligação do anticorpo a proteínas não-específicas foi minimizada pela pré-incubação da membrana de nitrocelulose com tampão de bloqueio (albumina 5%) por 90 minutos^{60,61}.

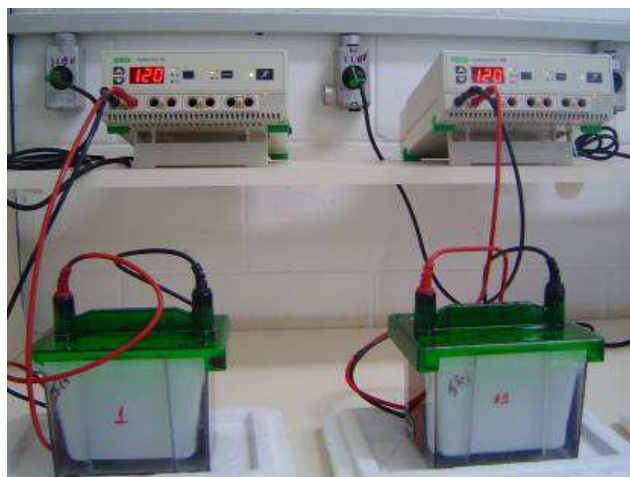


Figura 11: Separação das proteínas por eletroforese com fonte elétrica a 120 volts.

Após incubação com anticorpo primário específico, foi realizada incubação com anticorpo secundário, que possui em sua porção Fc uma peroxidase, que é uma enzima que se ligará ao reagente da reação de quimioluminescência que contém luminol, produzindo luz, que foi captada através do fotodocumentador Syngene[®] e programa “gene snap versão 7.12 Syngene.[®]”

O sinal foi detectado por meio de reação de quimioluminescência (SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate from Pierce Biothecnology, Inc. Rockford). A expressão da proteína estudada foi comparada com a expressão da β -actina.

- Apresentação dos dados

Os resultados são apresentados em unidades arbitrárias, como comparações diretas das bandas protéicas nas auto-radiografias obtidas pelo fotodocumentador, as quais foram quantificadas através de densitometria usando o programa “Gel-Pro Analyzer 6.0” (Exon-Intron Inc., Farrell, MD).

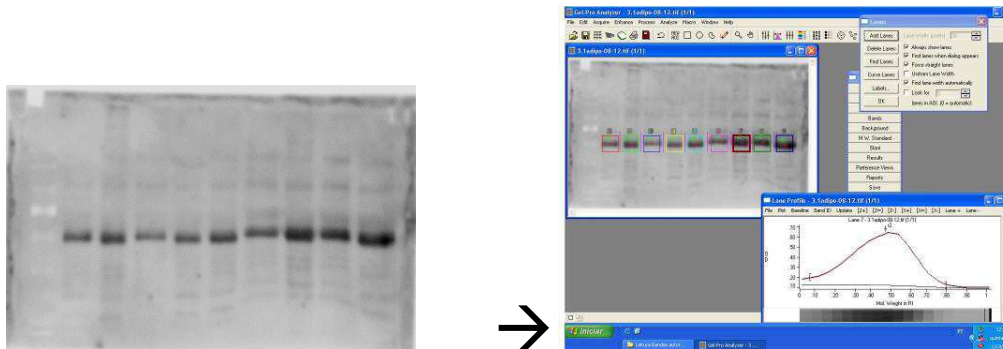


Figura 12: Análise das bandas auto-radiografadas pelo programa “Gel-Pro Analyzer 3.1”, por meio de densitometria óptica.

3.2.3 - Avaliação Antropométrica

Foram obtidos os seguintes parâmetros: peso atual (PA) em kg, estatura (E) em cm, prega cutânea triциptal (PCT) em mm, prega cutânea bicipital (PCB) em mm, prega cutânea sub-escapular (PCSE) em mm e prega cutânea supra-ílica (PCSI) em mm aferidas com o plicômetro Lange (Cambridge, Maryland). As medidas decorrentes avaliadas foram: índice de massa corpórea (IMC) em kg/m^2 e percentual de gordura corporal (%GC). A avaliação subjetiva global (ASG) foi avaliada somente nos pacientes DCAT e DCR.

O IMC foi calculado pela razão entre o peso (kg) e a altura (m) elevada ao quadrado. Desta forma o estado nutricional do indivíduo foi classificado de acordo com o IMC obtido⁶².

IMC (kg/m ²)	Classificação
< 16	Desnutrição III
16,0 a 16,9	Desnutrição II
17,0 a 18,49	Desnutrição I
18,5 a 24,9	Eutrofia
25,0 a 29,9	Sobrepeso
30,0 a 34,9	Obesidade I
35,0 a 39,9	Obesidade II
≥ 40	Obesidade III

Figura 13: Classificação do estado nutricional segundo o IMC. (Fonte: WHO, 1995)

A %GC foi calculada mediante o somatório das pregas cutâneas (PCT, PCB, PCSE, PCSI) de acordo com o gênero e a idade do paciente⁶³, para que o estado nutricional pudesse ser classificado segundo Lohman et al (1992)⁶⁴.

Classificação	Mulheres	Homens
Risco de doenças e desordens associadas à desnutrição	≤ 8%	≤ 5%
Abaixo da média	9 a 22%	6 a 14%
Média	23%	15%
Acima da média	24 a 31%	16 a 24%
Risco de doenças associadas à obesidade	≥ 32%	≥ 25%

Figura 14: Classificação da % GC para adultos. (Fonte: Lohman,1992)

A aplicação do formulário de ASG foi analisado mediante protocolo desenvolvido por Detsky et al. (1987)⁶⁵ (Anexo 8.7). O formulário avalia: história de perda de peso, sintomas gastrointestinais, capacidade funcional, ingestão dietética, e sinais físicos de desnutrição (edema, ascite, perda de gordura subcutânea e massa muscular). Os pacientes foram classificados em (A) bem nutrido, (B) moderadamente ou em risco de desnutrição e (C) desnutrição grave.

3.2.4 - Exames laboratoriais de rotina

Os níveis de proteína C reativa (PCR), colesterol total, triglicérides e pré-albumina séricos foram obtidos como exames de rotina e consultados no prontuário dos pacientes.

3.2.5 – Análise estatística

A comparação da adiponectina e leptina séricas entre os grupos DCAT, DCR e controle foi realizada utilizando Análise de Variância (ANOVA) e teste de significância de *Tukey-Kramer*. Aplicou-se o teste *t de Student* para a comparação do IADC entre os grupos DCAT e DCR. Os resultados foram expressos em média com desvio padrão, e o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Os resultados do imunoblot foram notificados como média com variação do erro padrão. Por meio do teste de *Kolmogorov Smirnov*, verificou-se que os dados obtidos seguiram a distribuição normal ou de Gauss ($p > 0,1$). Desta forma, foi utilizado teste *t de Student* para comparação de dois grupos (DCG e CG). Nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

A comparação entre os grupos DCAT, DCR e controle foi realizada utilizando-se ANOVA e teste de *Tukey-Kramer*, sendo significativo $p < 0,05$ nos parâmetros laboratoriais

e antropométricos, com exceção da ASG. A ASG foi aplicada apenas nos DCR e DCAT portanto foi utilizado teste *t de Student* com nível de significância $p < 0,05$.

4-RESULTADOS

4.1 - Níveis séricos de adiponectina e leptina

O nível sérico de adiponectina foi menor no grupo DCAT quando comparado com o grupo C ($p < 0,05$). Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados os grupos C e DCR ($p > 0,05$). Além disso, o nível de adiponectina foi similar entre os DCR e DCAT ($p > 0,05$). O nível sérico de leptina foi similar nos Grupos C, DCR e DCAT ($p > 0,05$).

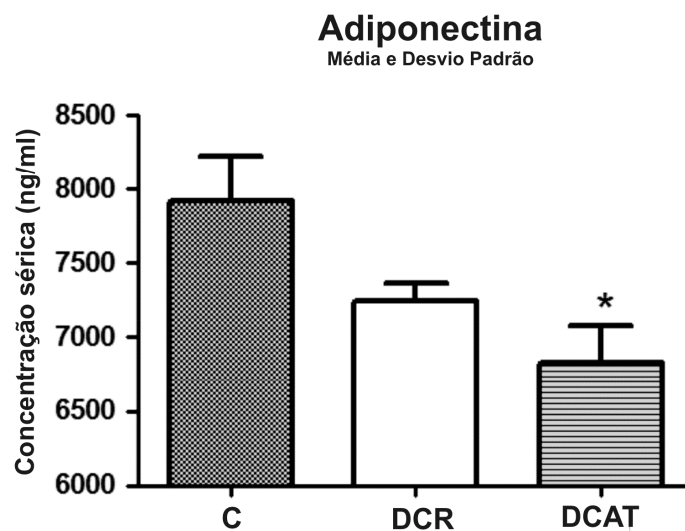


Figura 15: Concentração sérica de Adiponectina (ng/ml). Grupo DCAT - DC em atividade; Grupo DCR - DC em remissão; Grupo C- Controle. Para todas as condições os grupos DCR e DCAT n=8, e grupo C n=6. * $p < 0,05$ vs Controle.

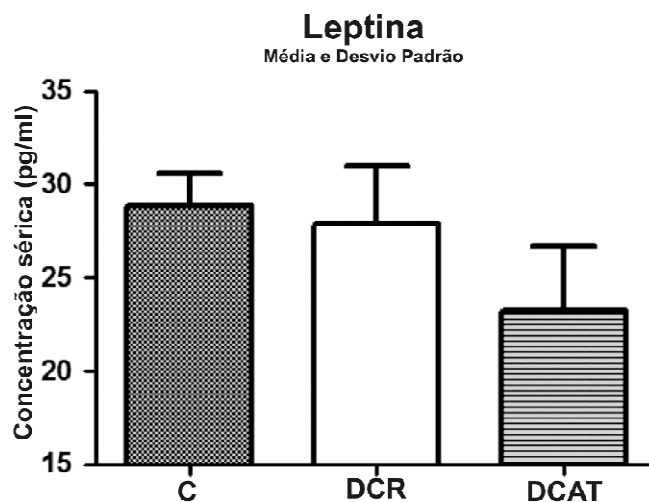


Figura 16: Concentração sérica de Leptina (pg/ml). Grupo DCAT- DC em atividade; Grupo DCR- DC em remissão; Grupo C - Controle. Para todas as condições os grupos DCR e DCAT n=8, e o grupo C n=6.

4.2 - Expressão de adiponectina no tecido mesenterial

A expressão da adiponectina no tecido adiposo mesenterial foi menor no grupo DCG quando comparado com o grupo CG ($p < 0,05$). A expressão de β -actina foi utilizada para padronizar a concentração de proteína das amostras.

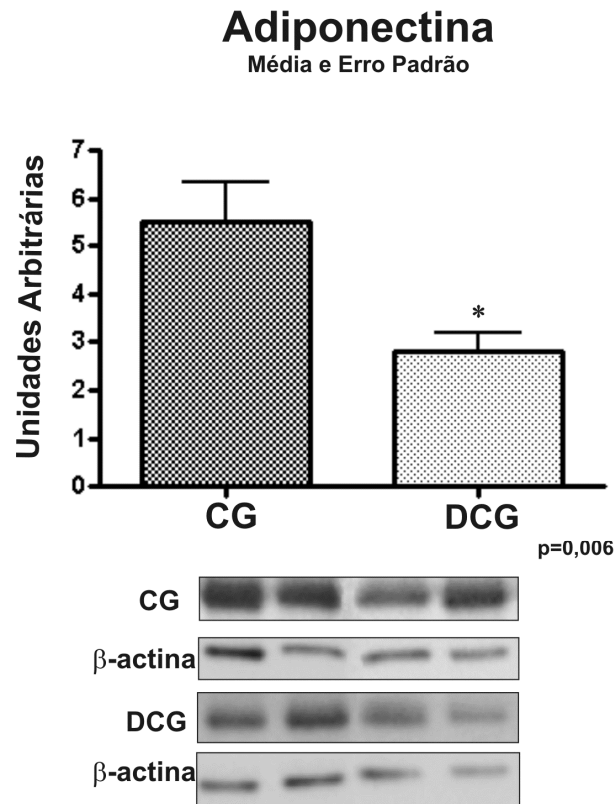


Figura 17: Análise representativa de Imunoblot e determinação da expressão da proteína de adiponectina no tecido adiposo do grupo CG (controle de gordura) e DCG (DC gordura). Para fins de ilustração cada banda representa um paciente. Para o grupo DCG, n=10; e o grupo CG, n=8, *p<0,05 vs CG.

4.3 - Níveis séricos da proteína C reativa

A concentração da PCR foi maior no grupo DCAT quando comparado ao grupo DCR e grupo controle (p<0,0001). O grupo DCR não apresentou alteração dos níveis de PCR quando comparados com o grupo C (p>0,05).

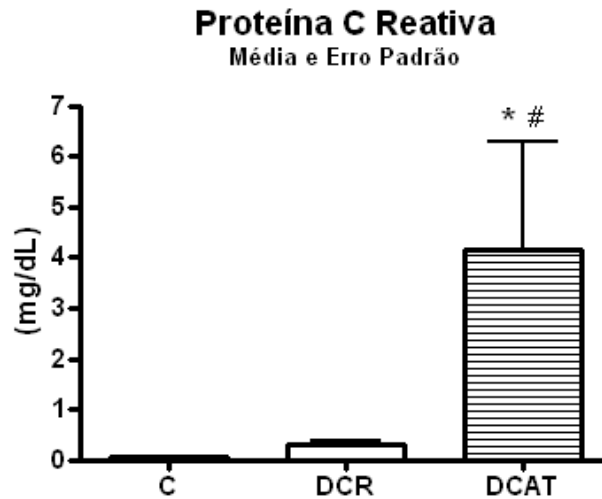


Figura 18: Concentração sérica de PCR (mg/dl). Grupo DCAT- DC em atividade; Grupo DCR- DC em remissão; Grupo C - Controle. Para todas as condições os grupos DCR e DCAT n=8, e o grupo C n=6. *p<0,05 vs Controle; #p<0,05 vs DC em remissão.

4.4 - Níveis séricos de colesterol total

A concentração sérica de colesterol total mostrou diferença significativa entre os grupos DCAT e DCR quando comparados com o grupo C ($p<0,05$). O mesmo não ocorre quando a comparação é realizada entre o grupo DCAT e o grupo DCR.

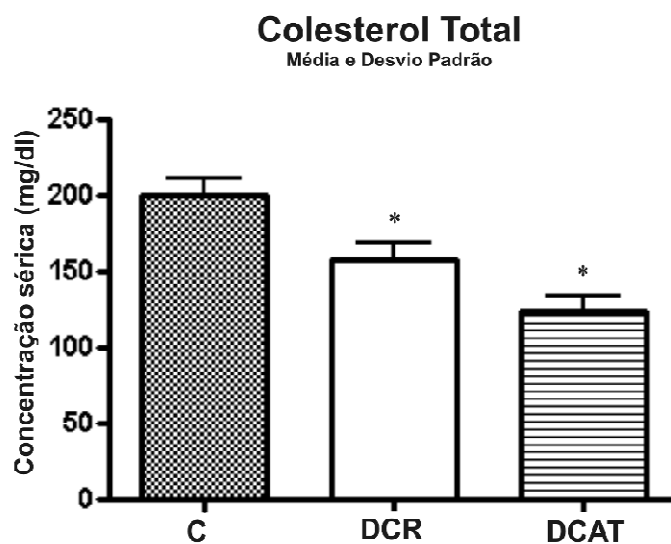


Figura 19: Concentração sérica de Colesterol (mg/dl). Grupo DCAT- DC em atividade; Grupo DCR- DC em remissão; Grupo C - Controle. Para todas as condições os grupos DCR e DCAT n=8, e o grupo C n=6. * $p < 0,05$ vs Controle.

4.5 - Níveis séricos de triglicérides

A concentração de triglicérides não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos DCAT, DCR e C ($p > 0,05$).

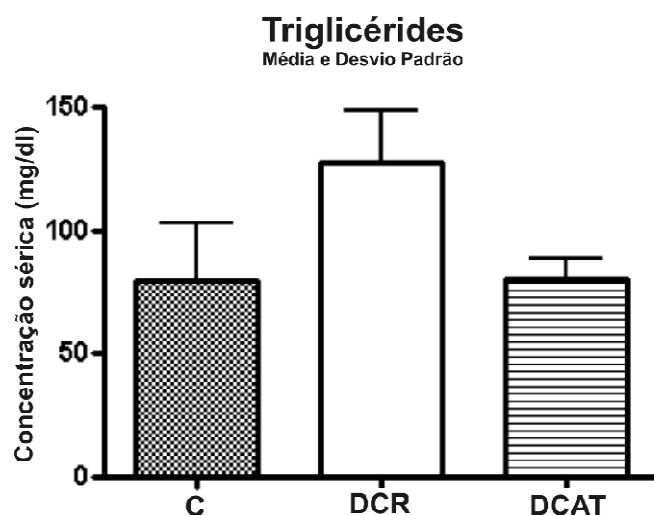


Figura 20: Concentração sérica de Triglicérides (mg/dl). Grupo DCAT- DC em atividade; Grupo DCR- DC em remissão; Grupo C - Controle. Para todas as condições os grupos DCR e DCAT n=8, e o grupo C n=6.

4.6 - Níveis séricos de pré-albumina

A concentração de pré-albumina foi menor no grupo DCAT quando comparado com o grupo C ($p < 0,05$). Além disso, o grupo DCAT quando comparado com o grupo DCR também apresentou menores níveis da proteína ($p < 0,01$). Os resultados foram similares entre os grupos C e DCR.

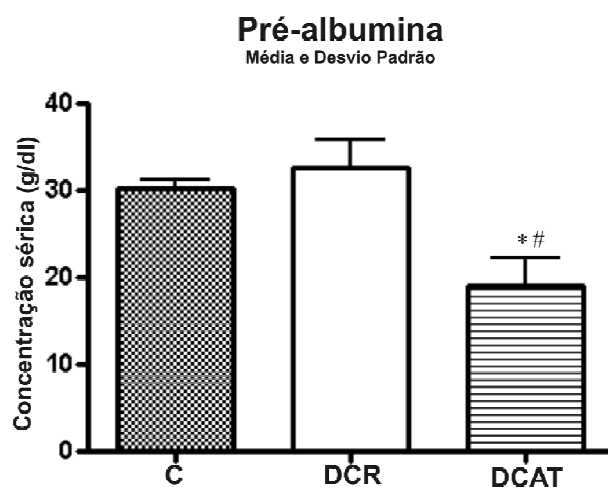


Figura 21: Concentração sérica de pré-albumina (g/dl). Grupo DCAT- DC em atividade; Grupo DCR- DC em remissão; Grupo C - Controle. Para todas as condições os grupos DCR e DCAT n=8, e o grupo C n=6. *p<0,05 vs Controle; #p<0,05 vs DC em remissão.

4.7 - Dados Antropométricos

4.7.1. Índice de massa corporal (IMC)

Os resultados foram similares entre os grupos DCAT, DCR e C ($p>0,05$) apresentando variações de 19-27; 21-26; 22-36 respectivamente.

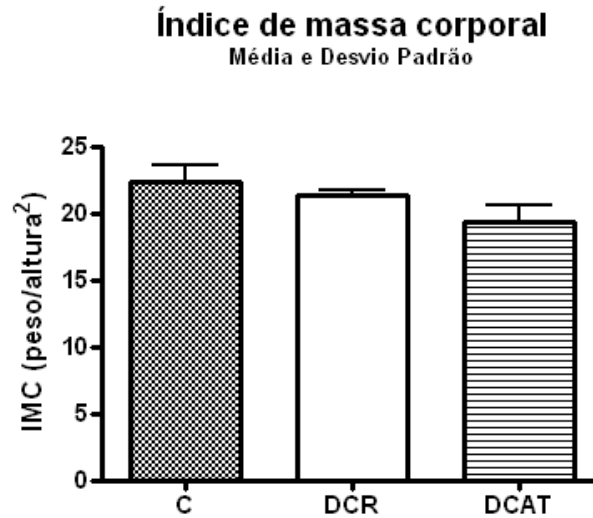


Figura 22: Medida do Índice de massa corporal ($\text{Kg}/\text{altura}^2$). Grupo DCAT- DC em atividade; Grupo DCR- DC em remissão; Grupo C - Controle. Para todas as condições os grupos DCR e DCAT $n=8$, e o grupo C $n=6$.

4.7.2. % Gordura corporal

O grupo DCAT apresenta menor porcentagem de gordura corporal quando comparado com o grupo C ($p=0.0403$). Não houve diferença significativa quando comparado o grupo DCAT com o grupo DCR. Os grupos C e DCR obtiveram resultados semelhantes.

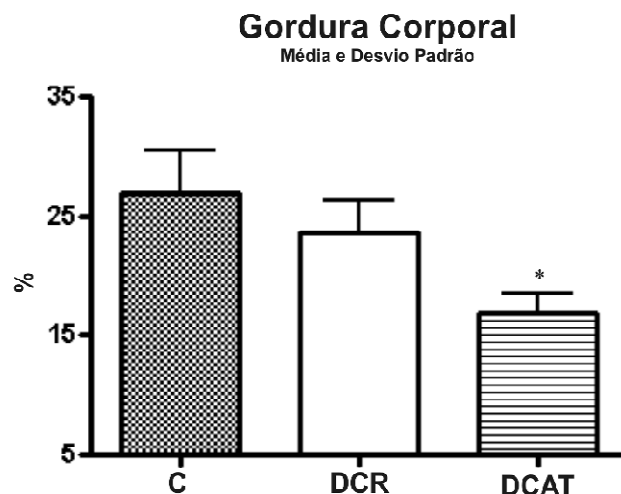


Figura 23: Medida de Gordura corporal (%). Grupo DCAT- DC em atividade; Grupo DCR- DC em remissão; Grupo C - Controle. Para todas as condições os grupos DCR e DCAT n=8, e o grupo C n=6. *p<0,05 vs Controle.

4.7.3. Avaliação Subjetiva Global (ASG)

O grupo DCAT apresenta maiores índices de desnutrição tanto moderada (50%) quanto grave (50%), quando comparado com o grupo DCR.

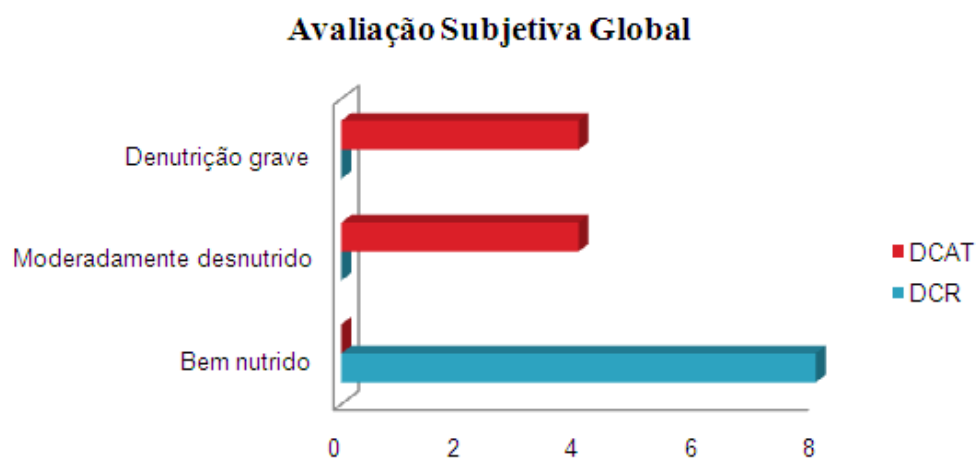


Figura 24: Avaliação Subjetiva Global. Grupo DCAT- DC em atividade; Grupo DCR- DC em remissão. Para todas as condições os grupos DCR e DCAT n=8. DCR n=8 bem nutrido, DCAT n=4 moderadamente desnutrido, DCAT n=4 desnutrição grave.

5- DISCUSSÃO

O tecido adiposo além de participar no metabolismo energético, e em processos imunológicos é considerado um órgão endócrino que secreta e expressa as adipocinas, dentre elas a adiponectina e leptina⁶⁶. A hipertrofia do tecido adiposo é descrita como sendo 50% da superfície intestinal que é coberta pelo mesentério, sendo uma característica marcante da doença^{67,68}. Um ensaio experimental observou que o tecido adiposo hipertrofiado apresentava redução de triglicerídeos, e adipocinas dentre elas leptina e adiponectina em camundongos com colite induzida por dinitrobenzeno sulfônico (DNBS)⁶⁷.

Estudos associando doença inflamatória intestinal (DII), adiponectina e controle saudável apresentam resultados controversos. De acordo com Valentini e col. (2009) há redução da adiponectina sérica em DC e RCUI quando comparados ao controle⁵⁸. Em outro esta redução foi observada apenas para o sexo feminino na DC quando comparado com o controle⁶⁹. Em contrapartida, Karmiris e col. (2006) evidenciaram resultados inalterados entre os três grupos (DC, RCUI e controle)¹⁶.

A redução das concentrações séricas da adiponectina está associada a estados inflamatórios crônicos e sua liberação para a corrente sanguínea a partir do tecido adiposo depende, dentre outros fatores, da correta conformação da proteína no retículo endoplasmático⁷⁰.

Segundo Yamamoto e col. (2005), a concentração e expressão da adiponectina na gordura mesenterial de humanos com DC mostram-se aumentada apenas na ausência de fístulas, analisando o comportamento da doença representado apenas por pacientes com doença fistulizante e não inflamatória⁸.

Essa redução nos nossos achados pode mostrar uma deficiência no mecanismo antiinflamatório na gordura mesenterial próxima à área intestinal afetada nas fases mais avançadas da doença crônica. Além disso, a gordura mesenterial pode apresentar

importante papel na manutenção do processo inflamatório intestinal, uma vez que o balanço alterado entre fatores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios nos adipócitos pode levar a ativação de células do sistema imune inato, como as células dendríticas e também do sistema imune adaptativo.

O papel da adiponectina no tecido adiposo hipertrofiado na DC, não está bem estabelecido e a maior parte dos estudos foram realizados em modelos animais⁵. Se por um lado a expressão aumentada de adiponectina leva a redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL1- β ⁷¹, outros estudos experimentais, com animais “Knockout” para adiponectina apresentaram proteção contra colite induzida quimicamente, porém, quando administrado adiponectina observa-se retorno do efeito pró-inflamatório⁷².

No presente estudo, entretanto, não houve diferença dos níveis de adiponectina sérica entre o Grupo DCAT e DCR, ou seja, entre os pacientes com DC em atividade e em remissão, isto pode ser explicado, pois os pacientes sem atividade clínica e endoscópica da doença podem ainda apresentar processo inflamatório na gordura mesentérica não detectado por esses exames complementares.

Por outro lado, exames realizados com ressonância magnética nuclear demonstraram avanços na captação de imagem intra e extra-luminal no intestino, e anormalidades morfológica e funcional, captando dentre outras alterações as ocorridas no mesentério⁷³ avaliando a atividade da doença⁷⁴.

No tecido adiposo mesentérico, a PCR foi analisada estando sua concentração aumentada em pacientes com DC quando comparados com RCUI e controle, apresentando correlação com a concentração sérica e a densidade do tecido adiposo mesentérico na DC²². De acordo com Peyrin-Biroulet et al. (2012) o tecido adiposo mesentérico é uma importante fonte de PCR, uma vez que sua produção está aumentada 140 vezes quando comparada

com o tecido adiposo subcutâneo na DC. O mesmo não ocorre no intestino (íleo/cólon) em níveis significativos⁷⁵.

Segundo Chen et al. (2006) as concentrações fisiológicas de leptina promovem a expressão hepática de PCR em humanos. Em paralelo, a PCR foi capaz de inibir as funções da leptina, indicando um potente regulador da mesma⁷⁶.

No estudo de Valentini e col. (2009), que compara DC, RCUI e controle saudável, a concentração sérica de leptina não diferiu entre os pacientes com DC e controles saudáveis, ao passo que nos doentes com RCUI houve aumento nos níveis séricos de leptina quando em atividade da doença⁵⁸.

Karmiris e col. (2006) observaram que a leptina sérica não apresentou diferença estatística quando se comparou DC com o controle saudável¹⁶, confirmando os achados do presente estudo.

No que se referem à leptina, os resultados do presente estudo não evidenciaram diferença dos níveis séricos entre os diferentes grupos avaliados, mostrando que este adipormônio pode não estar envolvido ou não possui papel preponderante na etiopatogenia da DC.

Segundo Waitzberg, Correia (2003) não existe um instrumento padrão-ouro de avaliação nutricional de doenças crônicas⁷⁷. O IMC é a ferramenta mais utilizada devido a simplicidade na aferição das medidas antropométricas, porém não faz distinção de massa magra e gordura. Muitos estudos comparando o IMC de pacientes com DC e controle saudável, demonstram diferentes resultados, em que alguns revelam estar diminuído o IMC^{78,79,80,81} e outros que o IMC não tem diferença significativa^{82,83,84}. No presente estudo não houve diferença entre os grupos, no entanto em dados não apresentados houve aumento na porcentagem de perda de peso, e os pacientes estavam em uso regular de corticóide.

Apesar do estado nutricional eutrófico dos pacientes com DCAT, os achados de pré-albumina demonstram estado de desnutrição, porém segundo Clemmons et al. (1985) com suporte nutricional adequado os níveis desta proteína tendem a aumentar em torno de 10mg/L⁸⁵. Baixos níveis de albumina sérica na DC são analisados mediante alterações decorrentes da atividade da doença como: febre, baixo consumo de proteína, perda intestinal, do que do estado nutricional, sendo o ideal nesse caso exames de pré-albumina¹¹.

A ASG é capaz de identificar desnutrição⁸⁶, o presente estudo mostrou desnutrição moderada (50%) e grave (50%) em pacientes DCAT com relação ao DCR que apresentaram adequada nutrição, confirmando as alterações de pré-albumina, colesterol, diminuição de gordura corporal¹¹, visto que estes pacientes se encontram em intensa atividade da doença evidenciada pelo aumento nos níveis de PCR.

Desreumaux et al. (1999) quantificou a gordura intra-abdominal na DC por meio do exame de ressonância magnética com relação a gordura corporal total, e demonstrou que apesar do aumento intra-abdominal, esta não reflete um aumento de gordura corporal total⁸⁷, que corrobora com nossos achados de menor de %CG na DCAT. Estudos correlacionam uma menor % de gordura corporal em pacientes com DC e RCUI quando comparados com controle saudável^{88,89}.

Geerling et al.(1999) relata em seu estudo que pacientes com DC de diagnóstico de longo período, apresenta alteração do metabolismo de ácidos graxos e conseqüente mudança de fosfolipídeos na corrente sanguínea comparado com DC de diagnóstico recente em fase de remissão da doença⁹⁰. Além disso, Hrabovský e col (2009) observaram alteração no processo de síntese e absorção de colesterol em pacientes com DC em atividade, mostrando redução nos níveis de colesterol total e frações⁹¹.

No estudo Ueda e col (2008), observaram que o colesterol sérico de pacientes com DC em atividade apresentaram menores níveis quando comparado com RCUI e controle⁹². Durante o período de inflamação intensa ocorre um prejuízo do metabolismo de lipoproteínas e culminando em alteração dos níveis de lipídeos e lipoproteínas nos pacientes⁹³.

Verificou-se que o nível de colesterol mostra-se diminuído tanto na DCAT quanto na DCR comparados ao controle no presente estudo, provavelmente pela manifestação subclínica da doença mesmo após ressecção intestinal, mantendo baixos níveis também de LDL. Em contrapartida, um estudo mostrou que ocorre melhora dos níveis de HDL após ressecção intestinal⁹⁴.

Desta forma, evidenciou-se na DC em atividade desnutrição protéico-calórica, mostrada pela diminuição da pré-albumina e da porcentagem do gordura corporal, mostrando a importância do monitoramento desses aspectos no acompanhamento de uma doença crônica, mesmo que o IMC esteja dentro do padrão de normalidade. Além disso, o estudo dos níveis de adiponectina no tecido mesentérico acometido pela DC e da integridade dos mecanismos secretórios desse adipormônio, por meio da dosagem sérica, mostram-se relevantes, apresentando importante papel no processo inflamatório.

A presença do aumento característico da gordura mesentérica na DC, a capacidade secretória de moléculas ativas pelos adipócitos, e a associação entre essas mudanças no tecido conectivo e a inflamação transmural, oferece bases para que o tecido adiposo mesentérico tenha um papel na fisiopatologia da doença. O tecido adiposo mesentérico pode ser um fator importante na manutenção da inflamação tanto localmente no tecido adiposo como na alça intestinal envolvida pela doença.

6- CONCLUSÃO

Baixos níveis de adiponectina sugerem uma deficiência nos mecanismos antiinflamatórios na gordura mesenterial durante as fases tardias da doença crônica contribuindo para perpetuar um estado inflamatório crônico.

Tendo em vista o perfil de desnutrição protéico-energética e reduzida % de gordura corporal, o aumento do tecido adiposo mesenterial associado à inflamação pode ter sido o responsável pela redução da adiponectina sérica e tecidual observado na DCAT.

Estudos das adipocinas, bem como os mecanismos envolvidos na redução e/ou aumento destas, podem auxiliar no entendimento do papel deste órgão endócrino na inflamação visando à descoberta de novos alvos terapêuticos e identificação de marcadores séricos da atividade da doença.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. *Jama* 1932;99:1223.
2. Quilici FA. Coloproctologia: histórias da história. *Rev Br Coloproct* 1994;14(1):43-5.
3. Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Gastroenterology* 2007; 369: 1641-1657.
4. Chuo JH. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2008;8:458-466.
5. Schäffler A, Schölmerich J. The role of adiponectin in inflammatory gastrointestinal diseases. *Gut* 2009 Mar;58(3): 317-322.
6. Neuman MG, Nanau RM. Inflammatory bowel disease: role of diet, microbiota, life style. *Transl Res* 2012 Jul;160(1):29-44.
7. Louis E, Collard A, Oger AF, Degroote E, Aboul Nasr El Yafi FA, Belaiche J. Behaviour of Crohn's disease according to the Vienna classification: changing pattern over the course of the disease. *Gut* 2001; 49: 777-82.
8. Yamamoto K, Kiyohara T, Murayama Y, Kihara S, et al. Production of adiponectin, an anti-inflammatory protein, in mesenteric adipose tissue in Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Disease* 2005, 54:789-796.
9. Best WR, Beckett JM, Singleton W. Rederived values of the eight coefficients of the Crohn's Disease Activity Index (CDAI). *Gastroenterology* 1979;77:843-846.
10. Yamamoto T, Nakahigashi M, Saniabadi AR. Review article: diet and inflammatory bowel disease - epidemiology and treatment. *Aliment Pharmacol Ther* 2009;30:99-112.

11. Campos FG, Waitzberg DL, Teixeira MG, Mucerino DR, Habr-Gama A, Kiss DS. Inflammatory bowel diseases. Principles of nutritional therapy. Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo 2002;57(4):187-198.
12. Lucendo AJ, De Rezende LC. Review: Importance of nutrition in inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol 2009; 15(17): 2081-2088.
13. Goh J, O'Morain CA. Review article: nutrition and adult inflammatory bowel disease. Aliment Pharmacol Ther 2003; 17: 307-320.
14. Gossum AV, Cabre E, Hébuterne X, Jepessen P, et al. ESPEN Guidelines on Parenteral Nutrition: Gastroenterology. Clinical Nutrition 2009;28:415-427.
15. Vannucchi H, Marchini JS. Subnutrição Protéico-energética. In: Cunha DF, Cunha SFC. Nutrição e Metabolismo-Nutrição Clínica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. p.27-33.
16. Karmiris K, Koutroubakis LE, Xidakis C, et al. Circulating Levels of Leptin, Adiponectin, Resistin, and Ghrelin in Inflammatory Bowel Disease. Inflammatory Bowel Disease 2006 Feb 12(2):100-105.
17. Geerling B.J; Badart-Smook A; Stockbrugger R.W; Brummer R.J. Comprehensive nutritional status in patients with long-standing Crohn disease currently in remission. Am J Clin Nutr 1998 May;(67)5:919-926.
18. Sheehan AL, Warren BF, Gear MW, et al. Fat-wrapping in Crohn's disease: pathological basis and relevance to surgical practice. Br J Surg 1992;79:955-958.
19. Leal RF, Coy CSR, Velloso LA, Dalal S, Portovedo M, Rodrigues VS, Coope A, et al. Autophagy is decreased in mesenteric fat tissue but not in intestinal mucosae of patients with Crohn's disease. Cell Tissue Res 2012;350(3):549-52.

- 20.Schäffler A, Schölmerich J, Büchler C. Mechanisms of Disease: adipocytokines and visceral adipose tissue-emerging role in intestinal and mesenteric diseases.Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology 2005 Feb,2(2):103-111.
- 21.Zulian A,Cancello R, Micheletto G,Gentilini D,Gilardini L,Danelli P,Invitti C.Visceral adipocytes: old actors in obesity and new protagonists in Crohn's disease. Gut 2012;61:86e94.
- 22.Biroulet LP, Chamaillard M,Gonzalez F, Beclin E, Decourcelle C, Antunes L, et al.Mesenteric fat in crohns disease:a pathogenetic hallmark or an innocent bystander.Gut 2007,56:577-583.
- 23.Rauci R, Rusolo F, Sharma A, Colonna G, Castello G, Costantini S. Functional and structural features of adipokine family. Cytokine 2013;61:1-14.
- 24.Mariman EC, Wang P. Adipocyte extracellular matrix composition,dynamics and role in obesity. Cell Mol Life Sci. 2010;67:1277-92.
- 25.Paul G, Schäffler A, Neumeier M, PhD, Fu"rst A, Bataille F,Buechler C,ller-Ladner UM, Lmerich JS,Rogler G, Herfarth H. Profiling Adipocytokine Secretion from Creeping Fat in Crohn_s Disease. Inflamm Bowel Dis 2006;12:471-477.
- 26.Funahashi T, Nakamura T, Shimomura I, Maeda K, Kuriyama H,Takahashi M, Arita Y, Kihara S, Matsuzawa Y. Role of adipocytokines on the pathogenesis of atherosclerosis in visceral obesity. Intern Med 1999;38:202-206.
- 27.Trayhurn P, Wood SI. Adipokines:inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. Journal of Nutrition 2004;92:347-355.
- 28.Trujillo ME, Scherer PE. Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. Endocr Rev 2006;27:762-78.

- 29.Vettor R, Milan G, Rossato M et al. Review article: adipocytokines and insulin resistance. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;22(Suppl 2):3-10.
- 30.Lin Y, Lee H, Berg AH et al. The lipopolysaccharide-activated Toll-like receptor (TLR)-4 induces synthesis of the closely related receptor TLR-2 in adipocytes. *J Biol Chem* 2000;275:24255-63.
- 31.Batra A, Pietsch J, Stroh T et al. TLR-specific cytokine production by preadipocytes and adipocytes – further evidence that adipose tissue is linked to innate immunity. *Gastroenterology* 2006;130(Suppl 2):A232.
- 32.Gay J, Tachon M, Neut C et al. Mesenteric adipose tissue is colonized by bacterial flora and express pathogen recognition receptors in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2005;128(Suppl 2):A503.
- 33.Scherer PE, Williams S, Fogliano M, BaldiniG, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusive in adipocytes.*Journal of Biological Chemistry* 1995;270(45):26746-26749.
- 34.Adamkzac M, Wiecek A. The adipose tissue as an endocrine organ. *Seminars in Nephrology* 2013;33(1):2-13.
- 35.Chandran M, Phillips S A,Ciaraldi T, Henry RR.Adiponectin: More than just another fat cell hormone. *Diabetes Care* 2003, 26(8):2442-2450.
- 36.Alaniz MHR, Takada J,Vale MICA,Lima FB. O tecido adiposo como órgão endócrino: da teoria à prática. *Jornal de Pediatria* 2007; 83:192-203.
- 37.Drew JE, Farquharson AJ, Padidar S, Duthie GG,Mercer JG.et al.Insulin, leptin,and adiponectin receptors in colon: regulation relative to differing body adiposity independent

of diet and in response to dimethylhydrazine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;293:G682-G691.

38.Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 1995;269(5223):543-6.

39.Zhang R, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994;372(6505):425-32.

40.Yarandi SS, Hebbar G, Sauer CG, Cole CR, Ziegler TR. Review: Diverse roles of leptin in the gastrointestinal tract: Modulation of motility, absorption, growth, and inflammation. *Nutrition* 2011; 27: 269-275.

41.Nishi Y, Isomoto H, Ueno H, Ohnita K, Wen C Y, Takeshima Y, et al. Plasma leptin and ghrelin concentrations in patients with Crohn,s disease. *World J Gastroenterol* 2005;11(46):7314-7317.

42.Sobhani I, Bado A, Vissuzaine C, Buyse M, Kermorgant S, Laugneau JP, et al. Leptin secretion and leptin receptor in the human stomach. *Gut* 2000;47:178-183.

43.Morris DL, Liangyou R. Review: Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;297: E1247–E1259.

44.Batra A, Zeitz M, Siegmund B. Adipokine signaling in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15 (12): 1897-1905.

45.Batra A, Stroh T, Siegmund B. Extraluminal factors contributing to inflammatory bowel disease. *WJG* 2011Feb 17(5):572-577.

46. Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115(5):911-919.
47. Barbier M, Vidal H, Desreumax P, Dubuquoy L, Bourreille A, Colombel JF, et al. Overexpression of leptin mRNA in mesenteric adipose tissue in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterol Clin Biol* 2005;27:1-5.
48. Otero M, Lago R, Lago F, Casanueva FF, Dieguez C, Reino JJG, Gualillo O. Review: Leptin from fat to inflammation: old questions and new insights. *Febs* 2005; 579:295-301.
49. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor- κ B – a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *The New England Journal of Medicine* 1997;336(15):1066-71.
50. Sitaraman S, Liu X, Charrier L, Gu LH, Ziegler TR, Gewirtz A, Merlin D. Colonic leptin: source of a novel pro-inflammatory cytokine involved in inflammatory bowel disease. *J Faseb* 2004,18(6):696-698.
51. Ge Q, Ryken L, Noel L, Maury E, Brichard SM. Adipokines identified as new downstream targets for adiponectin: lessons from adiponectin-overexpressing or -deficient mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011; 301: E326–E335.
52. Sacks DB. The role of scaffold proteins in MEK/ERK signaling. *Biochem Soc Trans* 2006;34(5):833-836.
53. Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol* 2004;68(2):320-44.
54. Fasshauer M, Kralisch S, Klier M, Lossner U, Bluher M, Klein J, Paschke R. Adiponectin gene-expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Feb 21;301(4):1045-50.

55. Peracchi, M., Bardella, M. T., Caprioli, F., Massironi, S., et al. Circulating ghrelin levels in patients with inflammatory bowel disease, *Gut* 2006, 55, 432–433.
56. Moschen AR, Kaser A, Enrich B, Mosheimer B, Theurl M, Niederegger H, Tilg H. Visfatin, an Adipocytokine with Proinflammatory and Immunomodulating Properties. *J Immunol* 2007; 178:1748-1758.
57. Luk T, Malam Z, Marshall JC. Pre-B cell colony-enhancing factor (PBEF)/visfatin: a novel mediator of innate immunity. *Journal of Leukocyte Biology* 2008; 83: 804-816.
58. Valentini L, Wirth EK, Schweizer U, Hengstermann S, Schaper L, Koernicke T, et al. Circulating adipokines and the protective effects of hyperinsulinemia in inflammatory bowel disease. *Nutrition* 25 (2009) 172–181.
59. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1977;6(72):248-254.
60. Velloso LA, Folli F, Sun XJ, White MF, Saad MJ, Kahn CR. Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:12490-12495.
61. Araújo EP, de Souza CT, Gasparetti AL, Ueno M, Boschero AC, et al. Short-term in vivo inhibition of receptor substrat-1 expression leads to insulin resistance, hyperinsulinemia, and increased adiposity. *Endocrinology.* 2005;146:1428-1437.
62. World Health Organization (WHO). Physical Status: The use and interpretation of anthropometry. WHO technical report series: 854;1995.
63. Durnin JV, Womersley J. Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women aged from 16 to 72 years. *Br J Nutr* 1974,32:77-97.

- 64.Lohman, T.G. Advances in body composition assessment. Champaign, Human Kinetics Publishers, 1992.
- 65.Detsky AS, Mclaughlin JR, Baker JP,Johnston N,Whittaker S,Mendelson RA, Jeejeebhoy KN.What is subjective global assessment of nutritional status.Journal of Parenteral and Enteral Nutrition 1987; 11:8-13.
- 66.Karmiris K, Koutrobakis IE, Kouroumalis EA. The emerging role of adipocytokines as inflammatory mediators in inflammatory bowel disease.Inflamm Bowel Dis 2005, 11(9):847-855.
- 67.Olivier I,Theodorou V, Valet P,Laurell IC, Guilou H, Michel JB.et al. Is crohns creeping fat an adipose tissue. Inflamm Bowel Dis 2011, 17(3):747-757.
- 68.Schaffler A, Herfarth H. Creeping fat in crohns disease:travelling in a creeper lane of research.Gut 2005, 54:742-744.
- 69.Weigert J, Obermeier F, Neumeier M, Wanninger J, Filarsky M, Bauer S, et al. Circulating levels of chemerin and adiponectina are higher in ulcerative colitis and chemerin is elevated in crohn disease.Inflamm Bowel Dis 2010; 16(4): 630-637.
- 70.Zhou L, Liu M, Zhang J, Chen H, Dong LQ, Liu F. DsbA-L alleviates endoplasmic reticulum stress – inducet adponectin downregulation. Diabetes 2010 (59): 2809-2816.
- 71.Arsenescu V, Meena L, Narasimhan TH, Ray AB, Chiara B, Donald A, Cohen WJS, et al. Adiponectin and Plant-Derived Mammalian Adiponectin Homolog Exert a Protective Effect in Murine Colitis. Dig Dis Sci . 2011(56): 2818-2832.
- 72.Fayad R, Pini M, Sennello JA,Cabay RJ, Chan L, Xu A,Fantuzzi G. Adiponectin Deficiency Protects Mice From Chemically Induced Colonic Inflammation. Gastroenterology 2007;132:601-614.

73. Masselli G, Gualdi G, MR imaging of the small bowel. *Radiology* 2012;264(2):333-348.
74. Ziech MLW, Bipat S, Roelofs JJTH, Nio CY, Mearadji B, Doorn SV, Spijkerboer AM, Stoker J. Retrospective comparison of magnetic resonance imaging features and histopathology in Crohn's disease patients. *European Journal of Radiology* 2011; 80:299-305.
75. Peyrin-Biroulet L, Gonzalez G, Dubuquoy L, Rousseaux C, Dubuquoy C, Decourcelle C, Saudemont A. Mesenteric fat as a source of C reactive protein and as a target for bacterial translocation in Crohn's disease. *Gut* 2012;61:78-85.
76. Chen K, Li F, Li J, Cai H, Strom S, Bisello A, et al. Induction of leptin resistance through direct interaction of C-reactive protein with leptin. *Nature Medicine* 2006, 12(4):425-432.
77. Waitzberg, D.L.; Correia, M.A.T.D. Nutritional assessment in the hospitalized patient. *Curr Opin Clin Nutr Metab* 2003,6:531-538.
78. Capristo E, Addolorato G, Mingrone G, Greco AV, Gasbarrini G. Effect of disease localization on the anthropometric and metabolic features of Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 1998;93:2411-2419.
79. Benjamin J, Makharia GK, Kalaivani M, Joshi YK. Nutritional status of patients with Crohn's disease. *Indian J Gastroenterol* 2008;27:195-200.
80. Harries AD, Rhodes J. Undernutrition in Crohn's disease: an anthropometric assessment. *Clin Nutr* 1985;4:87-915.

- 81.Sousa Guerreiro C, Cravo M, Costa AR, Miranda A, Tavares L, Moura-Santos P, et al.A comprehensive approach to evaluate nutritional status in Crohn's patients in the era of biologic therapy: a case control study. *Am J Gastroenterol* 2007;102:2551-2556.
- 82.Geerling BJ, Badart-Smook A, Stockbrugger RW, Brummer RJ.Comprehensive nutritional status in recently diagnosed patients with inflammatory bowel disease compared with population controls. *Eur J Clin Nutr* 2000;54:514-521.
- 83.Jahnsen J, Falch JA, Mowinckel P, Aadland E. Body composition in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Am J Gastroenterol* 2003;98:1556-1562.
- 84.Vagianos K, Bector S, McConnell J, Bernstein CN. Nutrition assessment of patients with inflammatory bowel disease. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2007;31:311-319.
- 85.Clemmons DR, Underwood LE, Dickerson RN, Brown RO, Hak LJ, MacPhee RD, Heizer WD.Use of plasma somatomedin-C/insulin-like growth factor I measurements to monitor the response to nutritional repletion in malnourished patients. *Am J Clin Nutr*. 1985 Feb;41(2):191-198.
86. Bin CM, Flores C, Álvares-da-Silva MR, Francesconi CFM. Comparison between handgrip strength, subjective global assessment, anthropometry, and biochemical markers in assessing nutritional status of patients with crohn's disease in clinical remission. *Dig Dis Sci* 2010; 55:137-144.
- 87.Desreumaux P, Ernst O, Geboes K, Gambiez L, Berrebi D,Müller-Alouf H, Hafraoui S, Emilie D, Ectors N, Peuchmaur M, Cortot A, Capron M, Auwerx J, Colombel JF. Inflammatory alterations in mesenteric adipose tissue in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1999; 117: 73-81.

88.Mijač D.D;Janković G.L.J; Jorga J; Krstić M.N. Nutritional status in patients with active inflammatory bowel disease: Prevalence of malnutrition and methods for routine nutritional assessment. *European Journal of Internal Medicine* 2010;21:315-319.

89.Capristo E, Mingrone G, Addolorato G, Greco AV, Gasbarrini G. Metabolic features of inflammatory bowel disease in a remission phase of the disease activity. *J Intern Med.* 1998 May;243(5):339-47.

90.Geerling BJ, van Houwelingen AC, Badart-Smook A, Stockbrugger RW & Brummer JM. Fat intake and fatty acid profile in plasma phospholipids and adipose tissue in patients with Crohn's disease, compared with controls. *American Journal of Gastroenterology* 1999; 94:410-417.

91.Hrabovský V, Zadák ZK, Bláha V, Hyšpler V, Karlík T, Martínek A, Mendlová A. Cholesterol metabolism in active Crohn's disease. *Wien Klin Wochenschr* 2009; 121: 270-275.

92.Ueda Y, Kawakami Y, Kunii D, Okada H, Azuma M, Le DS, Yamamoto S. Elevated concentrations of linoleic acid in erythrocyte membrane phospholipids in patients with inflammatory bowel disease. *Nutr Res.* 2008 Apr;28(4):239-44.

93.Levy E, Rizwan Y, Thibault L, et al. Altered lipid profile, lipoprotein composition, and oxidant and antioxidant status in pediatric Crohn disease. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 807-15.

94.Romanato G, Scarpa M, Ruffolo C, Marin R, Zambon S, Zanoni S, et al. Lipid and phospholipid profile after bowel resection for Crohn's disease. *Int J Colorectal Dis* (2008) 23:931-938.

8-ANEXOS

8.1 - Índice de Atividade da doença de Crohn

Índice de Atividade da Doença de Crohn			
Variável	Valores obtidos	Fator Multiplicador	Subtotal
Média do número de evacuações líquidas ou pastosas por dia nos últimos 7 dias		x 2	
Dor abdominal, em média nos últimos 7 dias(0- ausente,1-dor leve,2-dor moderada,3-dor intensa)		X 5	
Sensação de bem-estar, média dos últimos 7 dias (0-ótimo, 1-bom,2-regular,3-ruim,4-péssimo)		X 7	
Número de complicações 1- Artrite ou Artralgia 2- Irite ou Uveíte 3- Eritema nodoso ou pioderma gangrenoso ou estomatite aftóide 4- Fissura anal ou fístula ou abcesso anal 5- Outras fístulas 6- Febre		X 20	
Uso de antidiarréicos 0-não, 1- sim		X 30	
Massa abdominal (0-ausente,1-duvidosa,5-definida)		X 10	
Hematócrito Homem(47-Ht) Mulher(42-Ht)		X 6	
Peso percentual abaixo ou acima do peso corporal habitual		X 1	
Total IADC			

Valores de Referência:

Remissão = 150

Leve 150-250

Moderado 250-350

Grave > 350

8.2 - Aprovações pelo Comitê de Ética



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 27/04/10
(Grupo III)

PARECER CEP: N° 287/2010 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0216.0.146.000-10

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “NÍVEIS SÉRICOS DE ADIPONECTINA EM PACIENTES COM DOENÇA DE CROHN-CORRELAÇÃO COM O PERFIL NUTRICIONAL”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Viviane Soares Rodrigues

INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 12/04/2010

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 27/04/11 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Avaliar o nível plasmático de adiponectina em pacientes portadores de doença de Crohn.

III - SUMÁRIO

Trata-se de um estudo onde será realizada uma avaliação nutricional clínica (questionário alimentar e exame físico) e coletada uma amostra de sangue para se comparar os valores da adiponectina em paciente com doença de Crohn ativa e em remissão em voluntários saudáveis (15 indivíduos cada grupo), com duração de aproximadamente 2 anos.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Trata-se de projeto visando a dissertação da uma nutricionista ligada ao Serviço de Coloproctologia do Gastrocentro. O projeto não expõe os sujeitos da pesquisa a nenhum risco e pode trazer informações úteis no manejo nutricional dos mesmos. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido está adequado. Os pesquisadores irão submeter o projeto ao órgão de fomento para suprir o material de laboratório necessário para a realização das análises laboratoriais.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, bem como todos os anexos incluídos na pesquisa supracitada.

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

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

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

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

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

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

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

VII – DATA DA REUNIÃO

Homologado na IV Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 27 de abril de 2010.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br



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

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

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

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

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

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

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

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

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

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na V Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 26 de maio de 2009.

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

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

8.3 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Pacientes grupos DCAT e DCR

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Orientador: Raquel Franco Leal Telefone: (19)35218550

Nutricionista: Viviane Soares Rodrigues Telefone: (19) 8162-9161

Você está sendo convidado/a a participar de um trabalho de pesquisa cujo tema é:” **Níveis Séricos de Adiponectina em Pacientes com Doença de Crohn- Correlação com o Perfil Nutricional**” que será desenvolvido no Ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais pelo Departamento de Coloproctologia da Faculdade de Ciências Médicas no Hospital de Clínicas Unicamp da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), cujos detalhes seguem abaixo:

JUSTIFICATIVA DA PESQUISA

Tendo em vista a possível relação entre a desnutrição e os níveis de adiponectina sérica em fase aguda ou de remissão de pacientes com doença de Crohn, torna-se imperativo avaliar o estado nutricional desses pacientes, uma vez que se faz presente a perda ponderal além da inapetência. O perfil nutricional auxilia não somente na descrição da população atendida no Ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais do Hospital de Clínicas - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), mas também na melhor assistência ao paciente por meio de implementação precoce de terapia nutricional adequada.

PROCEDIMENTOS A QUE VOCÊ SERÁ SUBMETIDO/A

1. Nesta pesquisa você será analisado/a em relação ao estado nutricional no momento da consulta, em que será aplicado o recordatório alimentar habitual, bem como a aferição do peso e altura (peso aferido em balança e altura aferida através de um estadiômetro), circunferência do braço, circunferência do punho (aferidos através de fita métrica), avaliação de pregas cutâneas (tricipital, bíceps, sub escapular e supra ilíaca) utilizando o adipômetro.
2. O procedimento acima não resultará em qualquer dano à sua saúde, tampouco afetará o curso ou evolução do tratamento em andamento.
3. O procedimento de punção venosa para coleta de sangue que será utilizado nas análises laboratoriais são procedimentos de rotina de baixo risco e como complicação, hematomas no local de punção são raros.

OUTRAS INFORMAÇÕES

- 1- Você tem a garantia de receber qualquer informação adicional ou esclarecimentos que julgar necessários, a qualquer tempo do estudo;
- 2- A sua recusa em participar do estudo não lhe trará qualquer prejuízo no tratamento;
- 3- Você estará livre para deixar o estudo a qualquer momento, mesmo que tenha consentido em participar do mesmo inicialmente;
- 4- As informações obtidas pelo estudo serão estritamente confidenciais, estando garantidos o seu anonimato e privacidade na exposição e/ou publicação dos mesmos;
- 5- Não haverá compensações financeiras, nem também qualquer tipo de custo adicional para você, sendo sua participação neste estudo absolutamente livre e voluntária;
- 6- Sua participação no estudo estará encerrada após a primeira avaliação. Será contactado(a) pelos responsáveis pela pesquisa caso seja necessário coleta de sangue ou obtenção de informações, quando será orientado(a) sobre os motivos para o novo procedimento.
- 7- A pesquisadora o (a) manterá informado (a) em relação ao progresso da pesquisa, caso julgue a informação relevante;
- 8- Caso surja alguma intercorrência após a coleta de sangue, você deverá procurar o serviço de Pronto-Socorro do Hospital de Clínicas da UNICAMP e solicitar que o mesmo entre em contato com os profissionais responsáveis pelo ensaio clínico (vide telefones abaixo).
- 9- Poderá contactar a Secretaria da Comissão de Ética (fone 3521-8936) para apresentar recursos ou reclamações relacionadas ao processo de coleta dos dados.
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126 - Caixa Postal 6111 13083-887 Campinas – SP Fone (019) 3521 8936 Fax (019) 3521 7187 e-mail: cep@fcm.unicamp.br;
- 10- Obteve as informações necessárias para poder decidir conscientemente sobre a participação no referido estudo.

Nome do paciente: _____ RG/telefone de contato: _____

Endereço: _____ Assinatura

Data: ____/____/____ Responsável pela pesquisa: Viviane Soares Rodrigues

8.4 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Controle (níveis séricos de adipocinas)

Eu _____ (nome do paciente), RG: _____, estou ciente de estar participando da pesquisa científica, que tem por objetivo avaliar a correlação entre a concentração plasmática de adiponectina e o perfil nutricional em pacientes com DC em fase aguda e/ou de remissão. Fui informado(a) de que minha participação neste trabalho não mudará o meu tratamento neste hospital, que será o mesmo independentemente de eu estar ou não colaborando para este trabalho, e que minha identidade não será divulgada.

Autorizo e concordo, ser submetido a análise em relação ao estado nutricional no momento da consulta, em que será aplicado o recordatório alimentar habitual, bem como a aferição do peso e altura (peso aferido em balança e altura aferida através de um estadiômetro), circunferência do braço, circunferência do punho (aferidos através de fita métrica), avaliação de pregas cutâneas (tríceptal, bíceps, sub escapular e supra ilíaca) utilizando o adipômetro, para posterior análise comparativa.

Fui informado(a) que procedimento acima não resultará em qualquer dano à sua saúde, tampouco afetará o curso ou evolução do tratamento em andamento.

Fui esclarecido que o procedimento de punção venosa para coleta de sangue que será utilizado nas análises laboratoriais são procedimentos de rotina de baixo risco e como complicação, hematomas no local de punção são raros.

Prontifico-me a fornecer informações clínicas sobre meu estado geral caso seja necessário.

Campinas, ____ de _____ de 20 ____.

Paciente

Viviane Soares Rodrigues

Nutricionista Pesq. Responsável

Telefone para contato com pesquisador: 3521-8550 (ambulatório de coloproctologia).

Telefone do Comitê de Ética e Pesquisa local: 3521-8936.

8.5 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Pacientes grupo DCG

Eu _____(nome do paciente), HC:_____, estou ciente de estar participando da pesquisa científica, que tem por objetivo estudar a inflamação do intestino, causada pela doença de Crohn, por meio da análise da peça cirúrgica já previamente armazenada, na ocasião de meu tratamento. Fui informado(a) de que minha participação neste trabalho não mudará o meu tratamento neste hospital, que será o mesmo independentemente de eu estar ou não colaborando para este trabalho, e que minha identidade não será divulgada.

Autorizo e concordo que sejam realizados exames anátomo-patológico e de biologia molecular adicionais em fragmentos da peça cirúrgica armazenados na rotina por ocasião de minha cirurgia, e enviados para este estudo.

Autorizo a coleta de sangue por meio de punção no braço (membro superior) para complementação do estudo.

Prontifico-me a fornecer informações clínicas sobre meu estado geral e sobre meu acompanhamento pós-operatório, caso seja necessário.

Campinas, ____ de _____ de 20__.

Paciente

Raquel Franco Leal
Médico pesquisador responsável

Telefone para contato com pesquisador: 35217615 (ambulatório proctologia).

Telefone do Comitê de Ética em Pesquisa local: 35218936.

8.6 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Grupo Controle (tecido mesenterial)

Eu _____(nome do paciente), HC: _____, estou ciente de estar participando da pesquisa científica, que tem por objetivo estudar a inflamação do intestino, causada pela doença de Crohn. Fui informado(a) de que minha participação neste trabalho não mudará o meu tratamento neste hospital, que será o mesmo independentemente de eu estar ou não colaborando para este trabalho, e que minha identidade não será divulgada.

Participarei como grupo controle, autorizando e concordando que sejam realizadas biópsias do tecido gorduroso abdominal durante o procedimento cirúrgico eletivo a que serei submetido por conta do megacólon. Estas biópsias serão enviadas para exames anátomo-patológico e de biologia molecular a fim de comparação como grupo controle normal. Esta biópsia não afetará o procedimento cirúrgico de correção do megacólon.

Autorizo a coleta de sangue por meio de punção no braço (membro superior) para complementação do estudo, caso seja necessária.

Prontifico-me a fornecer informações clínicas sobre meu estado geral e sobre meu acompanhamento pós-operatório, caso seja necessário.

Campinas, ____ de _____ de 20__.

Paciente

Raquel Franco Leal
Médico pesquisador responsável

Telefone para contato com pesquisador: 35217615 (ambulatório proctologia).

Telefone do Comitê de Ética em Pesquisa local: 35218936.

8.7 – Avaliação Subjetiva Global

A. História

1. Alteração no peso

Perda total nos últimos 6 meses: total _____ Kg %perda: _____

Alteração nas últimas duas semanas: _____ aumento _____ sem alteração _____ diminuição

2. Alteração na ingestão alimentar

_____ sem alteração
 _____ alterada _____ duração= _____ semanas
 _____ tipo: _____ dieta sólida sub-ótima _____ dieta líquida completa _____ líquidos hipocalóricos _____ inanição

3. Sintomas Gastrointestinais (que persistam por > 2 semanas)

_____ nenhum _____ náusea _____ vômitos _____ diarreia _____ anorexia

4. Capacidade funcional

_____ sem disfunção (capacidade completa)
 _____ disfunção _____ duração= _____ semanas
 _____ tipo: _____ trabalho sub-ótimo _____ ambulatório _____ acamado

5. Doença e sua relação com necessidades nutricionais

Diagnóstico primário _____

Demanda metabólica (stress): _____ sem stress _____ baixo stress _____ stress moderado _____ stress elevado

B. Exame físico (para cada categoria, especificar: 0 = normal, 1+ = leve, 2+= moderada, 3+= grave)

_____ perda de gordura subcutânea (tríceps, tórax)
 _____ perda muscular (quadríceps, deltóide)
 _____ edema tornozelo
 _____ edema sacral
 _____ ascite

C. Avaliação subjetiva global (selecione uma)

_____ A = bem nutrido
 _____ B = moderadamente (ou suspeita de ser) desnutrido
 _____ C = gravemente desnutrido