

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e
Hepatologia

CRISTINA FLORES

A RELEVÂNCIA DO MARCADOR IMUNO-
HISTOQUÍMICO CD30 E DOS EOSINÓFILOS NO
DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DAS DOENÇAS
INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS

Porto Alegre
2013

CRISTINA FLORES

A RELEVÂNCIA DO MARCADOR IMUNO-HISTOQUÍMICO
CD30 E DOS EOSINÓFILOS NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL
DAS DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS

Programa de Pós-Graduação: Ciências em
Gastroenterologia e Hepatologia, nível de Doutorado,
da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul.

Orientadora: Luíse Meurer

Co-orientador: Carlos Fernando de Magalhães Francesconi

Porto Alegre
2013

CIP - Catalogação na Publicação

Flores, Cristina

A RELEVÂNCIA DO MARCADOR IMUNO-HISTOQUÍMICO CD 30
E DOS EOSINÓFILOS NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DAS
DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS / Cristina Flores. -
- 2013.

79 f.

Orientadora: Luíse Meurer.

Coorientador: Carlos Fernando de M. Francesconi.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Ciências em Gastroenterologia e
Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Doença de Crohn. 2. Retocolite Ulcerativa. 3.
Diagnóstico. 4. Histopatologia. 5. Imuno-histoquímica.
I. Meurer, Luíse, orient. II. Francesconi, Carlos
Fernando de M., coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho e esta conquista à minha Mãe Sirley, exemplo de carinho, dedicação e força. Ao meu Pai Luiz (in memoriam), exemplo de honestidade, caráter e amor.

AGRADECIMENTOS

Graças a Deus tenho muitas pessoas que participaram da minha trajetória até aqui, e que merecem meu reconhecimento com muito carinho.

Agradeço:

À Professora Doutora Luíse Meurer, minha querida orientadora por ter apostado na idéia deste trabalho, dedicando horas e horas ao estudo das “nossas” lâminas.

Ao meu primeiro mestre na Gastroenterologia Dr. Ismael Maguilnik, que me incentivou desde o princípio.

Ao Professor Doutor Carlos Francesconi, pelo exemplo de bom senso e atitude. E o apoio no momento mais difícil.

Ao Professor Doutor Sérgio Barros, seu incentivo foi fundamental para a realização deste trabalho.

À Flávia pela sua competência e carinho na confecção das lâminas para este estudo.

À Ceres pela sabedoria estatística e pela compreensão das minhas idéias, sempre com muito bom humor.

Às pessoas muito especiais que encontrei no “mundo da Doença Inflamatória Intestinal” que possuem um genuíno interesse em melhorar a vida dos pacientes com essa doença tão difícil, elas sabem que são.

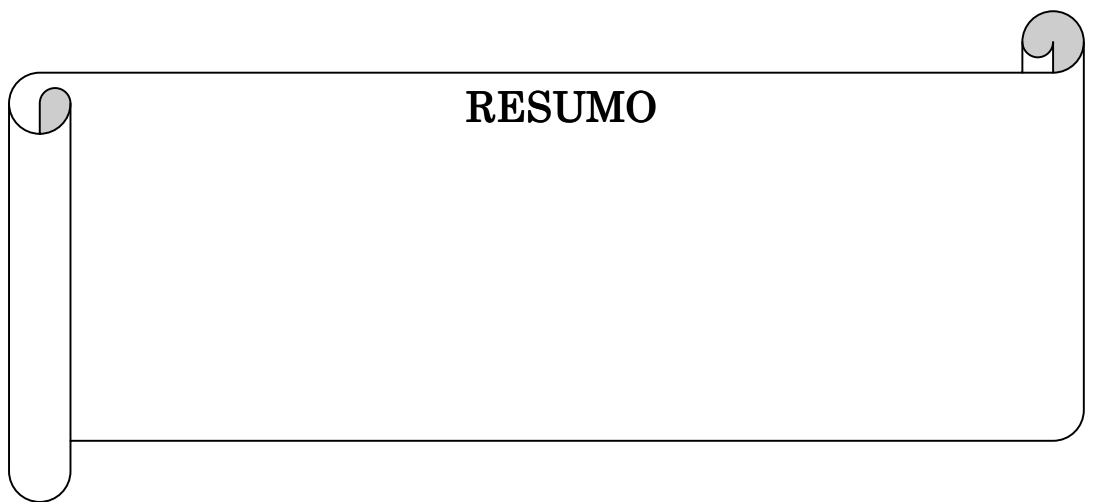
EPÍGRAFE

Ninguém comete erro maior do que não fazer nada porque só pode fazer um pouco.

Edmund Burke

O assunto mais importante do mundo pode ser simplificado até ao ponto em que todos possam apreciá-lo e compreendê-lo.

Charles Chaplin

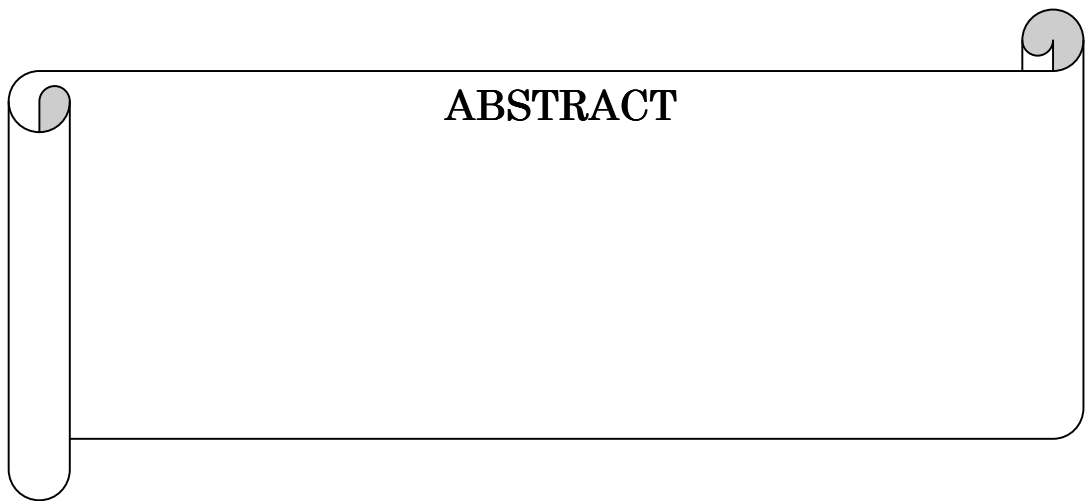


A RELEVÂNCIA DO MARCADOR IMUNO-HISTOQUÍMICO CD30 E DOS EOSINÓFILOS NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DAS DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS.

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são doenças crônicas incapacitantes com significativa morbidade. A Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RCU) são as maiores representantes. O diagnóstico é baseado na suspeita clínica e complementado por achados endoscópicos, histopatológicos e radiológicos. Como não existe um teste padrão, o diagnóstico destas doenças permanece sendo um problema para gastroenterologistas e patologistas. O desenvolvimento de terapias mais específicas torna cada vez mais importante o diagnóstico preciso para uma escolha terapêutica individualizada. A imunidade inata está ativada de forma semelhante nas duas DII, porém na RCU os linfócitos CD4 T_H2 são os principais envolvidos. Estes linfócitos expressam o receptor CD30 na sua membrana plasmática e produzem citocinas que ativam os eosinófilos. Levando em consideração o conhecimento fisiopatológico atual, este estudo tem como principal objetivo avaliar a relevância da expressão do marcador CD30 por imuno-histoquímica, a contagem de eosinófilos e as características histopatológicas no diagnóstico diferencial das DII. Foram avaliados 185 pacientes de um ambulatório especializado em um Hospital Universitário (105 com DC e 80 com RCU). O diagnóstico foi estabelecido pelos critérios de Lennard-Jones, revisados por um gastroenterologista especializado e corroborado por cinco anos de seguimento. As biópsias foram realizadas por diversos profissionais na rotina assistencial, porém todas foram analisadas por um patologista com experiência em tubo digestivo. Nenhum paciente estava usando tratamento no momento da coleta das biópsias. As variáveis histopatológicas que demonstraram poder estatístico para auxiliar no diagnóstico diferencial foram a extensão do processo inflamatório para a submucosa, a presença de granuloma, erosões aftóides e variabilidade de acometimento entre os fragmentos. Avaliando estas características em conjunto, foi possível obter uma acurácia de 69.1% para o diagnóstico diferencial entre DC e RCU. Estudando o segmento mais alterado encontrou-se uma mediana de eosinófilos de 42

(25,5 – 63,5), nos pacientes com DC e 107 (67 – 123) nos pacientes com RCU ($p < 0.001$). Assumindo como ponto de corte um número \geq a 70 eosinófilos, a sensibilidade foi de 78,3% e a especificidade de 71% favorecendo o diagnóstico de RCU, a área sob a curva *ROC* foi de 0,767 (IC 95%: 0,696–0,838). A imuno-histoquímica com CD30 demonstrou uma mediana de 3 células CD30⁺ (2-6) na DC e 33 (24-52) na RCU, demonstrando uma diferença estatística significativa para o diagnóstico diferencial entre as duas doenças ($p < 0,001$). Além disso, nos pacientes com RCU as células CD30⁺ estavam distribuídas mais frequentemente em agrupamentos nos centros dos folículos linfoides. O ponto de corte determinado pela curva *ROC* foi de 15 células marcadas (S = 97,5%, E = 94,3%, RV + = 17,1; RV = 0.03, área sob a curva: 0.967, IC 95%: 0.941 - 0.993). Todos estes parâmetros estudados tiveram capacidade discriminatória para o diagnóstico de DC e RCU. Designando um valor para cada variável, baseado no poder estatístico de cada uma e de forma a obter uma soma de 10 pontos no total, foi construído um escore histopatológico para o diagnóstico da DC. Considerando-se a soma das variáveis \geq 5 obteve-se uma especificidade de 100% e uma sensibilidade de 86,8%. Considerando 4 como ponto de corte do escore, a sensibilidade aumenta para 95,3%, e a especificidade reduz de 100% para 94,9%. Concluindo, o uso rotineiro da avaliação das características histopatológicas descritas em associação com a contagem de eosinófilos e células CD30⁺ proporciona uma alta acurácia no diagnóstico diferencial entre DC e RCU. Todos os parâmetros estudados são de fácil avaliação tanto por patologistas especialistas quanto generalistas. Sugere-se a realização de um estudo prospectivo para validação deste escore.

Palavras-chave: Doença de Crohn, Retocolite Ulcerativa, Diagnóstico, Histopatologia, Imuno-histoquímica.



THE RELEVANCE OF IMMUNOHISTOCHEMICAL MARKER CD30 AND EOSINOPHILS IN DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

Inflammatory bowel diseases (IBD) are chronic disabling diseases with significant morbidity, being Crohn's disease (CD) and Ulcerative colitis (UC) their greatest representatives. Diagnosis is based on clinical suspicious and complemented by endoscopic, histopathological and radiological findings. However, there is not a gold standard test, so it remained a problem for gastroenterologists and pathologists. The development of more targeted therapies makes it even more important to establish an accurate diagnosis for a better individualized therapeutic approach. Innate immune response is activated in both IBD, but in UC the lymphocytes CD4 T_H2-like are mainly engaged, this kind of lymphocytes has CD30 expressed in their plasma membrane and produces cytokines that activate eosinophils. Considering the current pathophysiological knowledge, this study aimed to evaluate the relevance of CD30 expression by immunohistochemical, eosinophil count and histopathological features in differential diagnosis of IBD. A total of 185 patients were evaluated (105 CD/ 80 UC). Patients were followed at a specialized clinic of a university hospital, diagnosed according to Lennard-Jones criteria reviewed by a gastroenterologist expert and corroborated by five years of follow up. Biopsy samples were taken by different professionals in routine care, but analyzed by an experienced gastrointestinal pathologist. None of the patients were using treatment at the time of biopsy. Of all the pathological variables assessed, those that had statistical capacity to assist in the differential diagnosis were extension of the inflammatory process to submucosa, granuloma, aphthous erosion and variability of involvement between fragments. Evaluating these variables together, an accuracy of 69.1% in the differential diagnosis between CD and UC was found. Assessing the most altered sample the median of eosinophils was 42 (25.5 – 63.5) in CD patients and 107 (67 – 123) in UC patients ($p < 0.001$). Assuming a cutoff ≥ 70 eosinophils, the sensitivity was 78,3% and specificity of 71% favoring the UC diagnosis, the area under the ROC curve was 0.767 (CI 95%: 0,696–0,838). Immunohistochemical CD30⁺ cells presented

with a median of 3 cells (2-6) in CD and 33 cells (24-52) in UC, demonstrating a highly significant statistical difference between the two diseases ($p < 0.001$). Besides, CD30⁺ cells were distributed most clustered in the center of lymphoid follicles in UC patients. The cutoff determined by ROC curve was 15 (S = 97.5%, E = 94.3%, LR + = 17.1; -RV = 0.03, AUC: 0.967, 95% CI: 0.941 - 0.993). All these parameters studied had discriminatory capacity for diagnosis of CD and UC. A value was assigned to each variable based on the statistical power of each, making a total sum of 10 points to build a histopathological score for the CD diagnosis. Setting the cutoff as ≥ 5 we found a specificity of 100% and a sensitivity of 86.8%. When we consider as cutoff as ≥ 4 points the score sensitivity comes to 95.3%, and reduces the specificity of 100% to 94.9%.

In conclusion, the use of routine assessment of the histopathological features described previously in association with the eosinophils and CD30⁺ cells count provides a high accuracy for CD and UC differential diagnosis. All parameters assessed here are easily performed by pathologists specialists and generalists. The next step seems to be the validation of this score in a prospective study.

Key words: Crohn's Disease, Ulcerative colitis, diagnostic, histopathology, immunohistochemical.

LISTA DE TABELAS, GRÁFICOS E FIGURAS.

Quadro 1. Diferenças entre as Doenças Inflamatórias Intestinais.....	21
Figura 1. Área de inflamação ao lado de área de mucosa com aparência normal.....	25
Figura 2. Granuloma sarcóide da Doença de Crohn.....	26
Quadro 2. Características microscópicas da DC e RCU.....	28
Quadro 3. Classificação de Viena 1998 e Montreal 2005.....	29
Quadro 4. Classificação da extensão inflamatória da RCU.....	29
Figura 3. Resumo das vias de interleucinas e da diferenciação das células T.....	34
Tabela 1. Caracterização da população estudada	48
Tabela 2 – Variáveis histopatológicas com diferença estatisticamente significativa e capacidade de auxiliar no diagnóstico diferencial entre DC e RCU.....	48
Tabela 3. Avaliação quantitativa dos eosinófilos (mediana e percentis) em cada segmento avaliado.....	49
Gráfico 1 Mediana do número de eosinófilos no segmento mais afetado na RCU e na DC.....	50
Figura 4. Imuno-histoquímica CD30.....	51
Tabela 4. Avaliação quantitativa e padrão de distribuição do marcador CD30 no segmento mais alterado.....	51
Gráfico 2 – Curva ROC para determinar o ponto de corte do CD30 para o diagnóstico de Doença de Crohn	52
Tabela 5 – Escore histopatológico para o diagnóstico da Doença de Crohn.....	53
Gráfico 3 – Curva ROC para determinar o ponto de corte do escore para diagnóstico de Crohn.....	54
Quadro 5 - Comparação da localização da Doença de Crohn do estudo atual com os achados da literatura.....	57

SUMÁRIO

Resumo.....	7
Abstract.....	10
Sumário de tabelas, gráficos e figuras.....	13
Abreviaturas e glossário.....	16
1. Introdução	17
2. Revisão Bibliográfica.....	19
2.1. Diagnóstico das Doenças Inflamatórias Intestinais.....	21
2.2. Histopatologia.....	24
2.3. Fenótipos e Classificação das Doenças Inflamatórias Intestinais.....	28
2.4. Mecanismos de Doença.....	30
2.4.a. Resposta imunológica.....	31
2.4.b Paradigma Th1/Th2.....	31
2.4.c Além do Th1 e Th2.....	33
2.4.d Eosinófilos.....	34
3. Proposição.....	36
4. Objetivos.....	38
5. Pacientes e Métodos.....	40
5.1. Local do estudo.....	41
5.2. População do estudo.....	41
5.3. Critérios de Exclusão.....	41
5.4. Métodos.....	41
5.5. Variáveis.....	42
5.5.a. Dados demográficos.....	42
5.5.b. Características histopatológicas.....	42
5.5.c. Marcadores imuno-histoquímicos.....	44
5.6. Considerações éticas.....	44
5.7. Análise estatística.....	44

6. Resultados.....	46
7. Discussão.....	55
8. Conclusões.....	62
9. Bibliografia.....	64
10. Anexos	
Anexo I – Consentimento Livre e Esclarecido.....	73
Anexo II – Consentimento Livre e Esclarecido para controles.....	75
Anexo III – Estudo Piloto.....	77
Anexo IV – Artigo enviado para publicação.....	80

ABREVIATURAS E GLOSSÁRIO

1. Antígeno CD – grupo de diferenciação atribuído às moléculas da superfície celular dos leucócitos, que são identificadas por um determinado grupo de anticorpos monoclonais.
2. CD30 – antígeno de superfície expresso preferencialmente pelos linfócitos Th2, membro da superfamília de receptores TNF.
3. céls/CGA - células por campo de grande aumento
4. Citocinas – são proteínas de baixo peso molecular que estimulam ou inibem a diferenciação, proliferação ou função das células imunológicas.
5. DC – Doença de Crohn
6. DII – Doenças inflamatórias intestinais
7. FIPE - Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre
8. HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre
9. IFN γ - Interferon gama
10. IL – Interleucinas: conhecidas também por linfocinas – são proteínas (polipeptídios) envolvidas na comunicação entre linfócitos. Produzidas por várias células não leucocitárias.
11. PMN – Polimorfonucleares
12. Quimiocinas – são um grupo de proteínas mensageiras (citocinas quimioatrativas), produzidas por diversas células para o recrutamento e ativação dos imunócitos.
13. RCU – Retocolite ulcerativa
14. Th ou CD4⁺ - linfócito T *helper*
15. Th1 – linfócito T *helper* tipo 1
16. Th2 – linfócito T *helper* tipo 2
17. Th17 – linfócito T *helper* tipo 17
18. TNF α - Fator de necrose tumoral alfa
19. TGF: Fator transformador de crescimento (*Transforming growth factor*)
20. TL1A: TNF- like factor 1A.



1- INTRODUÇÃO

As doenças Inflamatórias Intestinais (DII) são doenças crônicas evolutivas com significativa morbidade. A Doença de Crohn (DC) e a Retocolite ulcerativa (RCU) são suas principais representantes. O diagnóstico é estabelecido por um conjunto de características clínicas, radiológicas, endoscópicas e histopatológicas {Dube AK, 1998 #35; Tremaine WJ, 2007 #47; Abreu MT, 2007 #120; Absar S, 2006 #101; Sands BE, 2004 #17; Lennard-Jones JE, 1997 #155}.

A DC é uma doença inflamatória transmural que pode afetar qualquer parte do trato gastrointestinal. Apresenta-se com envolvimento descontínuo e transmural de diferentes segmentos e que pode desenvolver complicações como estenoses, abscessos e fístulas internas, enterocutâneas e perianais {Van Assche G, 2010 #11; Silverberg MS, 2005 #133}.

A RCU é uma doença não transmural que afeta a mucosa e, em alguns casos, a porção mais superficial da submucosa, sendo restrita ao reto e ao cólon. O padrão de distribuição inicia no reto e estende-se no sentido proximal, podendo chegar até o ceco. Em casos de colite extensa, que atinge todo o intestino grosso, podemos observar inflamação no íleo terminal a qual é denominada de ileíte por refluxo (*"backwash ileitis"*) {Dignass A, 2012 #23; Silverberg MS, 2005 #133}.

Existem diferenças estabelecidas entre estas duas formas primordiais de DII (quadro 1), no entanto em 20% dos casos o diagnóstico correto não é realizado devido às limitações dos procedimentos diagnósticos e sobreposição de achados e características clínicas, endoscópicas e histopatológicas {Absar S, 2006 #101; Price AB, 1978 #43}. A incidência de colite indeterminada tem sido relatada em 2% a 16% dos casos após o exame histopatológico completo da peça cirúrgica {Matsui T, 2003 #39; Wells AD, 1991 #132; Sands BE, 2004 #17}. Estima-se que 30 a 40% das biópsias não possuem características discriminatórias definitivas {Cross SS, 2002 #51; Dejaco C, 2003 #123; Dube AK, 1998 #35; Guindi M, 2004 #48; Martland GT, 2007 #105; Odze R, 2003 #54}. No caso das biópsias endoscópicas, a tarefa de estabelecer o diagnóstico diferencial é ainda mais difícil, pois os fragmentos de uma biópsia endoscópica muitas vezes são superficiais e dificultam a avaliação da profundidade da inflamação {Dube AK, 1998 #35; Matsui T, 2003 #39}.



2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1.Diagnóstico

A classificação precisa das DII e sua expressão fenotípica são fundamentais para a tomada de decisões terapêuticas e seguimento dos pacientes, além de melhorar o nosso entendimento sobre sua evolução, prognóstico e patogênese {Nikolaus S, 2007 #8; Pontte ACA, 2010 #114}. O avanço no conhecimento fisiopatológico tem demonstrado que o envolvimento de determinadas vias inflamatórias e sua rede de citocinas são mais comuns na DC do que na RCU e vice-versa. {Nikolaus S, 2007 #8}. O desenvolvimento de novas terapias, que têm como alvo principal algumas citocinas, bloqueio de integrinas e alguns receptores, tem tornado os medicamentos cada vez mais específicos, aumentando a importância do estabelecimento do diagnóstico preciso das DII para abordagem individualizada da melhor estratégia terapêutica {Sandborn WJ, 2012 #167; Hanauer SB, 2006 #109; Lichtenstein GR, 2009 #115; Rutgeerts P, 2005 #14; Sandborn WJ, 2012 #166; Silverberg MS, 2001 #121}. Na DC a cirurgia geralmente é reservada para complicações como estenoses, perfurações e abscessos. Uma proctocolectomia total com construção de uma bolsa ileal pode ser considerada uma boa alternativa na RCU, mas não na DC, devido a um alto índice de complicações associadas {Bataille F, 2003 #99; Guindi M, 2004 #48; Nasser Y, 2010 #18}. Os pacientes com DII apresentam um risco aumentado de desenvolvimento de adenocarcinoma colorretal após 8 a 10 anos de doença. Está indicada a vigilância para detecção de displasia através da colonoscopia com biópsias {Dignass A, 2012 #144}. Nos casos de RCU, quando a displasia é detectada normalmente indica-se a colectomia total; a decisão quanto ao tipo de cirurgia deve ser cuidadosamente avaliada nesta mesma situação em um paciente com DC {Sachar DB, 2007 #1; Shen B, 2007 #9; Kiran RP, #153}.

Quadro 1. Diferenças entre as Doenças Inflamatórias Intestinais.

Diferenças entre DC e RCU

Doença de Crohn	RCU
Intestino delgado está envolvido em 80% dos casos	Doença confinada ao cólon
Reto é geralmente poupado	Retossigmóide está sempre envolvido
Fístula, massas inflamatórias e abscessos são comuns.	Não ocorrem fístulas
Lesões perianais significativas presentes em 30% dos casos.	Lesões perianais significativas não ocorrem
A parede intestinal é afetada assimetricamente e de forma segmentar.	A parede intestinal é afetada simetricamente e de forma contínua.
A aparência endoscópica é segmentar, com ulcerações ao lado de segmentos de mucosa normal.	Inflamação difusa e contínua.
Microscopicamente a inflamação estende-se transmuralmente; e as lesões têm distribuição focal.	A inflamação é confinada à mucosa, exceto em casos graves.
Granulomas epitelióides podem ser detectados em 25% dos casos.	Granulomas epitelióides típicos nunca ocorrem

Adaptada de Odze 2003.

O diagnóstico das DII é firmado pela combinação de aspectos clínicos, laboratoriais, radiológicos, endoscópicos e histopatológicos {Van Assche G, 2010 #11; Carpenter HA, 2000 #96; Cornaggiaa M, 2011 #118; Targan SR, 2007 #124}. Não existe um teste considerado padrão para o diagnóstico diferencial entre RCU e DC. A ileocolonosopia é o procedimento diagnóstico de escolha, pois permite a avaliação da distribuição e intensidade do processo inflamatório e a coleta de biópsias para análise histopatológica {Van Assche G, 2010 #11; Leighton JA, 2006 #20; Lichtenstein GR, 2009 #115;

Kornbluth A, 2005 #16; Bentley E, 2002 #100}. A acurácia do diagnóstico histológico permanece sendo um importante problema a ser resolvido {Dejaco C, 2003 #123; Cross SS, 2002 #51; Dube AK, 1998 #35}. Não existe uniformidade das estratégias utilizadas na obtenção das biópsias (número ideal de fragmentos, locais das biópsias), nem dos critérios histopatológicos utilizados para definição diagnóstica, embora a coleta deva ser realizada em todos os segmentos, alterados ou não, e identificadas em frascos separados {Carpenter HA, 2000 #96; Geboes K, 2009 #26; Jenkins D, 1997 #21; Bentley E, 2002 #100}. O estudo de Dejaco e colaboradores demonstra que a avaliação de biópsias segmentares acrescenta em 26% na acurácia diagnóstica quando comparada à avaliação de dois fragmentos de biópsia do cólon direito e esquerdo. A diferença na acurácia diagnóstica destas duas estratégias deve-se ao fato de que muitas características histopatológicas da DC e RCU se sobrepõem, diferindo principalmente em sua distribuição, focal na DC e difusa na RCU {Dejaco C, 2003 #123}. A variação na interpretação dos achados anatomopatológicos é conhecida através de estudos que avaliam a variabilidade interobservadores {Farmer M, 2000 #34; Bentley E, 2002 #100}. Theodossi e colaboradores {Theodossi A, 1994 #131}, estudaram a magnitude da variação da interpretação entre 10 patologistas generalistas e um especialista em patologia do trato gastrointestinal ao examinarem os mesmos cortes de espécimes de doença de DC e RCU. A variabilidade da concordância entre os observadores foi de 65–76%; a RCU foi mais facilmente diagnosticada de forma correta, enquanto a DC foi frequentemente classificada equivocadamente como RCU.

Do ponto de vista endoscópico, existem fatores de confusão, como as lesões periapendiceais ou focais no ceco na RCU, lesões intercaladas com áreas normais em pacientes com RCU parcialmente tratados {Odze R, 2003 #54}. Os exames radiológicos não fornecem detalhes sobre a mucosa, de forma que 50% das lesões mais leves não são adequadamente visualizadas pelo trânsito de delgado. Cápsula endoscópica, enteroscopia e estudos radiológicos por tomografia computadorizada e ressonância magnética estão cada vez mais sensíveis para o estudo do intestino delgado, porém nem sempre estão amplamente disponíveis {Kornbluth A, 2005 #16; Stange EF, 2008 #111; Van Assche G, 2010 #11; Lee SS, 2009 #13; MacKalski BA, 2006 #15; Solem CA, 2008 #14}.

Outros fatores podem obscurecer o diagnóstico correto, incluindo o uso de medicamentos, a gravidade da doença, a experiência dos médicos clínicos, cirurgiões e patologistas, além da própria limitação do arsenal diagnóstico disponível {Farmer M, 2000 #34; Geboes K, 2002 #106}. Quando a inflamação está confinada ao cólon, esta dificuldade torna-se ainda mais evidente, pois é uma região anatômica comum às duas doenças.

Historicamente, a expressão colite indeterminada foi utilizada em casos de colite fulminante (definida como colite grave com sinais sistêmicos de toxemia e frequentemente com dilatação colônica), uma apresentação na qual as características clássicas da RCU podem ser obscurecidas pela gravidade e profundidade das ulcerações, pelo envolvimento transmural, e um reto relativamente poupado, características estas geralmente associadas à DC {Swan NC, 1998 #19; Price AB, 1978 #43}. Mesmo em centros com grande experiência em DII, ainda existe um grupo de pacientes que permanecem com diagnóstico incerto e são classificados como colite indeterminada {Guindi M, 2004 #48; Martland GT, 2007 #105; Moum FB, 1997 #127; Tremaine WJ, 2007 #47}.

Devido à grande variedade de características morfológicas que podem ser vistas nas DII, a prevalência do diagnóstico de colite indeterminada é altamente dependente do nível de experiência e conhecimento do patologista. Por exemplo, Farmer *et al.*, realizou um trabalho em que a acurácia diagnóstica de 24 patologistas universitários foi comparada com a de um único patologista especialista em tubo digestivo e com especial interesse em DII. Foram revisadas amostras de 84 colectomias de pacientes com DII. O patologista especialista realizou um diagnóstico diferente em 45% dos espécimes, e na maioria dos casos resultou em mudança de diagnóstico de RCU para DC.

2.2. Histopatologia

A análise histopatológica das peças cirúrgicas e amostras de biópsia do cólon são de extrema importância no estabelecimento do diagnóstico das DII, no entanto existe uma série de dificuldades enfrentadas pelos patologistas:

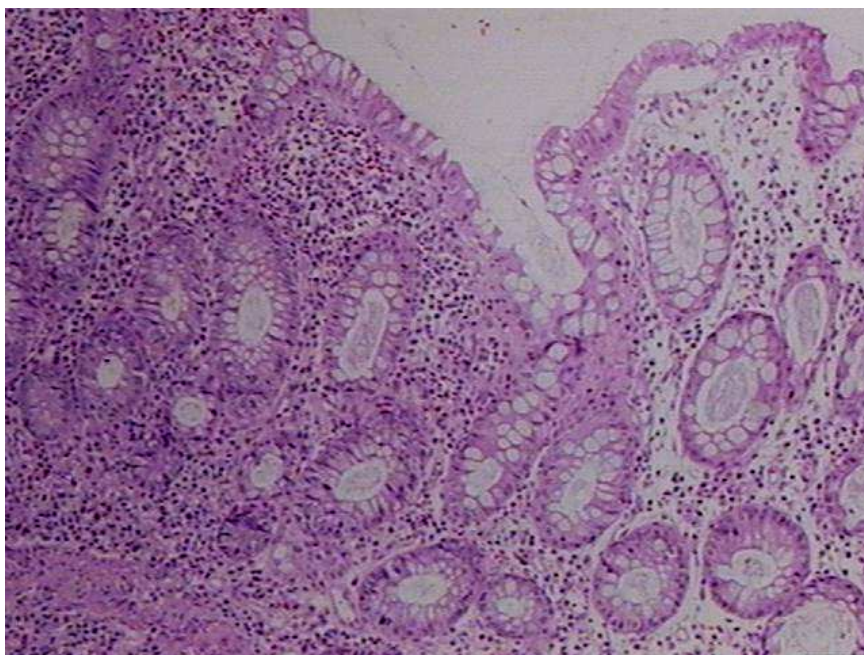
1. ausência de ponto estabelecido entre o que deve ser considerado normal ou características mínimas para determinar uma inflamação clinicamente importante;
2. grande sobreposição das características histopatológicas da maioria das doenças inflamatórias do cólon;
3. ausência de conhecimento da acurácia e reprodutibilidade de muitas características usadas para o diagnóstico;
4. ausência de terminologia padronizada para descrição histopatológica e diagnóstica {Dejaco C, 2003 #123; Odze R, 2003 #54; Yantiss RK, 2007 #42}.

O foco mais precoce e fundamental da inflamação na RCU é o epitélio críptico, caracterizando-se pela presença de polimorfonucleares (PMN) no epitélio glandular, denominado como criptite, e os abscessos crípticos que são caracterizados pelo acúmulo de PMN na luz da glândula. A inflamação crônica do epitélio leva à perda de mucina; há um intenso infiltrado inflamatório na lâmina própria com plasmocitose basal. Outra característica fundamental é a inflamação difusa da mucosa. Esta inflamação difusa pode não ser facilmente reconhecida endoscopicamente nos quadros mais precoces, sendo identificada somente pela inspeção microscópica {Finkelstein SD, 2002 #25; Geboes K, 2008 #104; Geboes K, 2009 #26; Jenkins D, 1997 #21}.

A inflamação na DC não é propriamente direcionada ao epitélio da cripta e pode abranger qualquer porção da mucosa. A inflamação superficial muitas vezes ocorre nas proximidades de agregados linfóides e pode ter a aparência típica de ulcerações e erosões aftóides. A topografia de distribuição é multifocal e de intensidade variável, com focos de inflamação intensa ao lado de áreas de mucosa com aparência normal (figura 1). Outras características que apoiam o diagnóstico da DC são a presença de granulomas epitelióides (figura 2) e a inflamação ultrapassando a muscular da mucosa e estendendo-se para a submucosa {Pierik M, 2005 #59}. O granuloma da DC deve ser distinguido do granuloma reacional associado à ruptura de criptas que pode ocorrer na RCU {Finkelstein SD, 2002 #25; Geboes K, 2008 #104; Geboes K, 2009 #26; Odze R, 2003 #54; Papadakis KA, 2002 #53; Jenkins D, 1997 #21}.

O íleo normalmente não está envolvido na RCU, no entanto, como mencionado previamente, em pacientes com pancolite grave pode ocorrer inflamação nos centímetros distais do íleo, a chamada ileíte de refluxo. Nestes casos, a presença de ulcerações profundas e metaplasia pilórica auxiliam no diagnóstico diferencial, favorecendo a ileíte de Crohn {Odze R, 2003 #54; Geboes K, 2009 #26}.

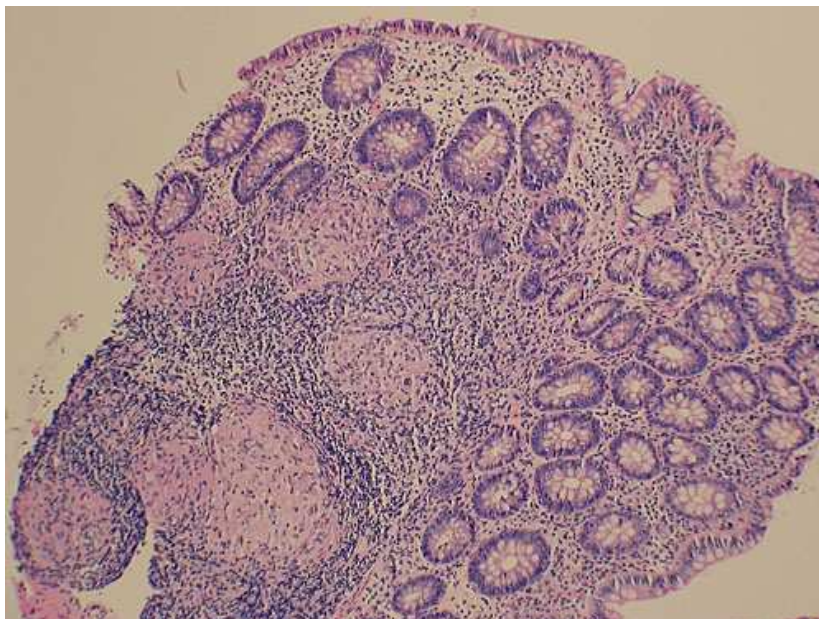
Figura 1. Área de inflamação ao lado de área de mucosa com aparência normal.



Em 1997, a Sociedade Britânica de Gastroenterologia publicou diretrizes para o diagnóstico de DII na biópsia inicial {Jenkins D, 1997 #21}. Estas diretrizes foram baseadas em uma revisão sistemática da literatura onde poucos critérios foram tidos como reprodutíveis e acurados. Os critérios elegíveis com moderada reprodutibilidade tiveram um valor de kappa de pelo menos 0,4, ou porcentagem de concordância de pelo menos 80%. Estes critérios também tiveram que atingir uma sensibilidade e especificidade de 50% ou mais, em pelo menos um dos estudos avaliados. Assim, nesta revisão, as características que favoreciam o diagnóstico de RCU foram a distorção de criptas e inflamação difusa da mucosa. Os critérios que favoreciam o diagnóstico de DC foram distorção de criptas e inflamação descontínua. A presença de granulomas foi bastante específica, porém com baixa sensibilidade. Desde então, outros autores têm revisitado este tema, por vezes construindo escores e cálculos

complexos que dificultam a utilização na prática corrente e por patologistas generalistas. {Yantiss RK, 2007 #42; Geboes K, 2005 #57; Tanaka M, 1999 #29; Sasaki Y, 2002 #207}.

Figura 2. Granuloma epitelióide da Doença de Crohn



Bentley e colaboradores realizaram uma oficina internacional com diversos patologistas para determinar a influência de uma ou múltiplas biópsias na acurácia e reprodutibilidade dos diferentes critérios utilizados para o diagnóstico histopatológico das DII. Ficou demonstrado que a avaliação de múltiplas biópsias propicia uma maior acurácia, particularmente na DC, onde o diagnóstico correto foi feito em 24% dos casos com biópsias do reto e em 64% quando avaliadas múltiplas biópsias tomadas ao longo do cólon. Houve melhora na capacidade de diagnosticar a RCU, embora menos pronunciada (64% para 74%). Neste estudo, as características que favoreceram o diagnóstico de DC foram a presença de granulomas e a inflamação focal e desigual. Por outro lado, a presença de irregularidade difusa das criptas, infiltrado difuso de polimorfonucleares e redução do número de criptas favoreceram o diagnóstico de RCU {Bentley E, 2002 #100; Bentley E, 2002 #100}. Os autores apresentaram as definições de anormalidade histopatológicas em 4 grupos:

1. Arquitetura da mucosa – distorção glandular
2. Celularidade da lâmina própria – aumento e alteração na distribuição de tipos celulares usualmente presentes, presença de granulomas e células gigantes.
3. Infiltração de polimorfonucleares – na lâmina própria, no epitélio críptico (criptite), no lúmen da cripta (abscesso críptico) e na superfície do epitélio.
4. Anormalidades no epitélio – depleção de mucina, dano à superfície do epitélio, mudanças metaplásicas, presença de linfócitos intra-epiteliais, apoptose, colágeno subepitelial.

Existem trabalhos avaliando as características histopatológicas de maior valor discriminatório e analisando as dificuldades em estabelecer o diagnóstico diferencial entre DC e RCU {Bentley E, 2002 #100; Cross SS, 2002 #51; Talbot IC, 2005 #97; Tanaka M, 1999 #29; Theodossi A, 1994 #131}.

Muitas destas características são úteis no diagnóstico diferencial entre inflamações agudas e crônicas, no diagnóstico diferencial entre as diversas causas de inflamação crônica do intestino ou até mesmo, na avaliação de atividade da inflamação, porém não auxiliam no diagnóstico diferencial entre a DC e a RCU. No quadro (Quadro 2) abaixo estão apresentadas as características microscópicas clássicas na RCU e na DC não tratadas. Outro obstáculo encontrado na prática é que algumas das características que auxiliam no diagnóstico diferencial entre as DII não podem ser avaliadas em fragmentos de biópsias como envolvimento transmural, fissuras, trajetos fistulosos e fibrose {Goldman H, 1994 #130; Papadakis KA, 2002 #53; Lennard-Jones JE., 1989 #3}

Quadro 2. Características microscópicas da DC e RCU

RCU	DC
Alterações difusas e contínuas	Alterações segmentares
Envolvimento retal	Envolvimento retal variável
Alterações mais acentuadas distalmente	Variabilidade de acometimento
Ausência de fissuras	Fissuras e trajetos fistulosos
Ausência de granulomas	Presença de granulomas

Adaptado de Odze R, 2003.

2.3. Fenótipos e Classificação das Doenças Inflamatórias Intestinais

As DII são um grupo heterogêneo. A caracterização dos subgrupos de pacientes com comportamentos e evoluções diversas possui importância fundamental na compreensão das bases fisiopatológicas destas doenças, na avaliação prognóstica e na escolha da estratégia terapêutica mais apropriada para cada situação. Em 2003, um grupo de especialistas foi formado com o intuito de revisar uma classificação previamente existente {Gasche C, 2000 #135}, e elaborar uma nova, baseando-se na evolução do conhecimento, examinando a aplicabilidade destes na prática diária, integrando os conhecimentos clínicos, moleculares e sorológicos. O resultado da análise deste grupo de especialistas foi relatado no Congresso Mundial de Gastroenterologia realizado em Montreal, no Canadá, em 2005 {Silverberg MS, 2005 #133}. A classificação das DII e sua correlação com aspectos genéticos, sorológicos e fenotípicos foi intensamente recomendada por este grupo de estudiosos, devendo servir como base fundamental para trabalhos futuros.

Quadro 3 Classificação de Viena e Montreal.

	Vienna, 1998	Montreal, 2005	
Idade do	A1 - ≤ 40 a	A1- <16 a	
Diagnóstico	A2 - > 40 a	A2- 17 a 40 a A3- > 40 a	
Localização			<u>Modificador TGI superior</u>
	L1 – íleo terminal	L1 – íleo terminal	L1 + L4
	L2 – cólon	L2 – cólon	L2 + L4
	L3 – ileocolônica	L3 – ileocolônica	L3 + L4
	L4 – TGI superior	L4 – TGI superior	
Comportamento			<u>Modificador</u> <u>Doença</u>
	B1 – não penetrante/ não estenosante	<u>perianal</u> B1 – não penetrante/ não estenosante	B1p
	B2 – Estenosante	B2 – Estenosante	
	B3 – Penetrante	B3 – Penetrante	B2p B3p

A classificação da RCUI leva em consideração a extensão e gravidade da doença, sendo útil para guiar escolha de tratamento e o prognóstico.

Quadro 4. Classificação da extensão inflamatória da RCU segundo Montreal 2005

CLASSIFICAÇÃO	DEFINIÇÃO
E1 – proctite ulcerativa	Envolvimento limitado ao reto
E2 – colite esquerda	Envolvimento distal ao ângulo esplênico
E3 – colite extensa	Envolvimento aquém do ângulo esplênico

Diversos estudos têm sido realizados com intuito de identificar fatores de pior prognóstico. Alguns destes fatores têm sido identificados (idade precoce de início da doença, presença de doença perianal à apresentação, tabagismo, etc.), porém não

existem testes laboratoriais, características endoscópicas ou radiológicas definidas no início do curso da doença que possam prever o desenvolvimento de complicações ou uma evolução mais grave da doença e que sirvam de guia para uma tomada de decisão precoce de um tratamento mais intenso e específico para o manejo individualizado dos pacientes {Bataille F, 2003 #99; Thia KT, 2010 #136; Cosnes J, 2002 #134; Etchevers MJ, 2009 #138; Gasche C, 2005 #58; Romberg-Camps MJL, 2009 #27}.

O termo colite indeterminada pode suscitar alguma controvérsia, por esta razão a sugestão gerada pelo relatório do grupo de trabalho no Congresso Mundial de 2005 é de que este termo seja utilizado apenas quando a análise da peça cirúrgica não for claramente diagnóstica. Nos casos em que a avaliação das biópsias endoscópicas não apresentar características definitivas de DC ou RCU o diagnóstico seja referido como colite não classificada {Silverberg MS, 2005 #133}.

2.4. Mecanismos de Doença

A DC e a RCU são doenças inflamatórias idiopáticas, crônicas, recidivantes, imunologicamente mediadas. Embora sua exata etiologia ainda seja incerta, o resultado de estudos experimentais e em humanos têm proporcionado uma série de entendimentos na patogênese. Estas doenças são caracterizadas por várias suscetibilidades genéticas que levam à resposta exacerbada das células T às bactérias comensais do intestino {Di Sabatino A, 2012 #188; Kaser A, 2010 #212; Sartor RB, 2006 #73}. O início e a reativação destas doenças são desencadeados por fatores ambientais que transitoriamente quebram a barreira mucosa estimulando a resposta imunológica ou alterando o equilíbrio entre as bactérias entéricas patogênicas e comensais {MacDonald TT, 2005 #63; Jump RL, 2004 #189}. Espera-se que estes novos conhecimentos e entendimentos ajudem a desenvolver melhores métodos diagnósticos e a identificar diferentes fenótipos e subgrupos de pacientes com estas doenças tão heterogêneas, quiçá podendo auxiliar na melhor escolha terapêutica {Maddur MS, 2012 #158; Hanauer SB, 2006 #109; Vermeire S, 2011 #76}.

2.4.a. Resposta Imunológica

A relação normal entre a microbiota comensal e o intestino humano é simbiótica, onde ocorre uma diminuição da resposta imunológica a uma série de estímulos bacterianos e antígenos alimentares, aos quais, o intestino está constantemente exposto {Jump RL, 2004 #189; Kraus TA, 2005 #185}. Neste contexto, o intestino humano apresenta um grau de inflamação crônica sem que isto implique em um diagnóstico de doença ou anormalidade, chamado de estado de tolerância {Kraus TA, 2005 #185; Jump RL, 2004 #189}. O que distingue a DII de uma resposta inflamatória vista no intestino normal é a inadequação regulatória da resposta imunológica anti-inflamatória {Bamias G, 2007 #64; Di Sabatino A, 2012 #188; Kayama H, 2012 #186}. No indivíduo saudável, o intestino torna-se inflamado em resposta a um potencial patógeno e então, retorna ao estágio normal de tolerância quando o patógeno é eliminado. Nos pacientes com DII, geneticamente suscetíveis, o sistema imunológico da mucosa permanece cronicamente ativado determinando um processo inflamatório constante. {Khor B, 2011 #187; Schenk M, 2008 #182}

2.4.b Paradigma Th1/Th2

Evidências científicas têm-se acumulado sugerindo a existência de respostas polarizantes distintas pelas células T CD4+ e CD8+. Os linfócitos T *helper* CD4+ podem ser divididos em pelo menos 2 subgrupos: Th1 e Th2 {Annunziato F, 1999 #36; FussIJ., 2008 #183}. A diferenciação do linfócito T *helper* precursor (Th0) em Th1 e Th2 é um processo fundamental durante a resposta imune {FussIJ., 2008 #183}. Estas duas subpopulações produzem diferentes tipos de citocinas, exibem propriedades funcionais distintas e expressam preferencialmente alguns marcadores de ativação. Os linfócitos diferenciados apresentam receptores distintos para quimiocinas. As células Th1 secretam interleucina 2 (IL-2), Fator de necrose tumoral alfa (TNF α), e interferon gama (IFN γ) {Camoglio L, 1998 #184}. Enquanto que, os linfócitos Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 {Mannon PJ, 2011 #178; Annunziato F, 1999 #36; Heller F, 2005 #3;

Van Kampen C, 2005 #86}. Embora, os clones de células T humanas possuam características similares, esta dicotomia estrita incluindo todas as citocinas como descritas em ratos é mais raramente encontrada em humanos. Assim, a melhor definição dos linfócitos Th1 parece estar na habilidade de produzir IFN γ , mas não IL-4, e vice-versa {Heller F, 2005 #1; Strober W, 2011 #38}.

Algumas moléculas de superfície estão preferencialmente associadas aos linfócitos Th1 ou Th2. As moléculas Th1 associadas são o CD26, IFN γ de membrana e o gene ativador de linfócitos (LAG)-3, por outro lado o CD62L e CD30 são preferencialmente expressos nos linfócitos Th2 {D'Elis MM, 1997 #45; Zimmerman NP, 2008 #23; Danese S, 2005 #88}. Mais recentemente, alguns autores têm relatado a associação de receptores de quimiocinas com determinados tipos de linfócitos. Sendo assim, os linfócitos Th1 expressam preferencialmente CXCR3 e CCR5 (receptor para RANTES), por outro lado os Th2 são identificados pelos CCR3, CCR4 e CD-30 {Manousou P, 2008 #37; D'Elis MM, 1997 #45; Zimmerman NP, 2008 #23; Oki M, 2005 #24; Annunziato F, 1999 #36; Lamkhieoued B, 2002 #44; Losana G, 2002 #60; Danese S, 2005 #88; Jo Y, 2003 #204}.

A diferenciação de linfócitos Th1 é induzida pela IL-12, citocina chave produzida pelos macrófagos e células dendríticas {Jiang H, 2006 #89}. O padrão de citocinas, observado clinicamente em casos de inflamação crônica e doenças auto-imunes, incluindo a DC, caracteriza-se principalmente pela presença de IFN γ , IL-2, e TNF α , além da promoção da produção de anticorpos para opsonização e fixação de complemento, ativação de macrófagos, citotoxicidade celular dependente de anticorpos e hipersensibilidade do tipo tardio {Fuss IJ., 2008 #183}. Neste contexto, as células Th1 podem ser consideradas como responsáveis pela resposta do hospedeiro dependente de fagócitos. Por outro lado, a citocina chave para a diferenciação dos linfócitos Th2 é a IL13, produzida por células da linhagem dos eosinófilos e mastócitos {Heller F, 2005 #4; Bamias G, 2005 #85; Dignass A, 2012 #144; Fuss IJ, 2004 #190}. Estes linfócitos por sua vez, produzem IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 e proporcionam um auxílio à resposta imune humoral, incluindo as imunoglobulinas IgE e IgG1, através da ativação de mastócitos e eosinófilos e facilitação de síntese de IgA {Strober W, 2011 #38; Heller F, 2005 #2; Spencer LA, 2010 #200}. Por estas características, podemos nos referir às células Th2

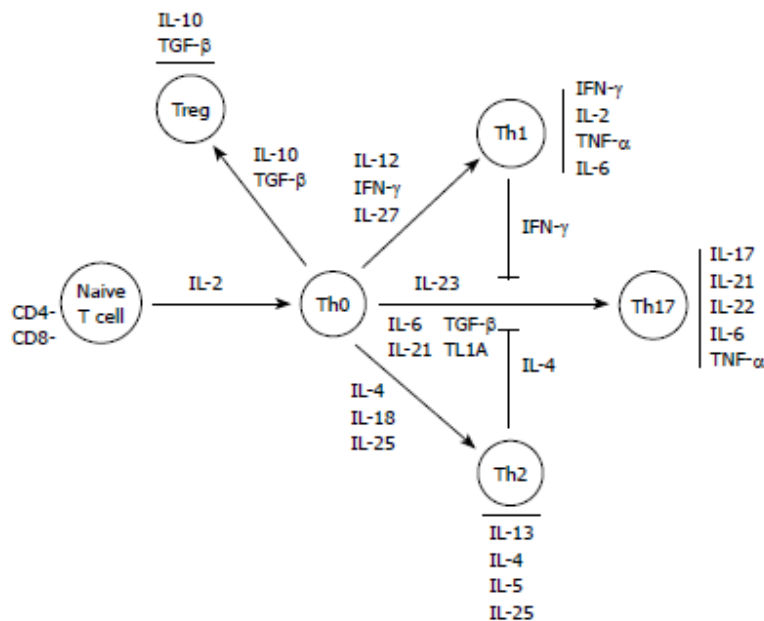
como as responsáveis pela resposta imune do hospedeiro independente de fagócitos. As evidências sugerem que a resposta imunológica com predomínio Th2 seja a mais envolvida na patogênese da RCU {Shale M, 2008 #33; Strober W, 2011 #168}.

2.4.c Além do Th1 e Th2

Recentemente, outras populações de linfócitos T foram identificadas e seu papel na patogênese das doenças inflamatórias tem se tornado proeminente {Sarra M, 2010 #61}. As células T regulatórias (Treg) são importantes para o controle da resposta imune aos autoantígenos, prevenindo a autoimunidade e mantendo a tolerância. Por outro lado, a IL-23, secretada por células do sistema imunológico inato, estimula a diferenciação de linfócitos T em um subtipo atualmente denominado Th17 que secreta interleucina 17 (IL17) {Maddur MS, 2012 #36; Abraham C, 2009 #71; Fujino S, 2003 #66; Ho"lta" V, 2008 #62; Kobayashi T, 2008 #180; Maddur MS, 2012 #158; Brand S, 2009 #179}. A IL17 tem sido encontrada em quantidades elevadas na mucosa dos pacientes com DC e RCU {Kobayashi T, 2008 #180; Christophi GP, 2012 #181; Liu Z, 2009 #82; Fujino S, 2003 #66}.

Resumindo (Figura 3), a DC está associada com produção excessiva de IL-12/IL-23, IFN- γ e IL-17, e a RCU com produção aumentada de IL-13 {Fuss, 2004 #190; Mannon PJ, 2011 #178; Strober W, 2011 #168; Christophi GP, 2012 #181}

Figura 3. Resumo das vias de interleucinas e da diferenciação das células T.



2.4.d Eosinófilos

Eosinófilos são encontrados na lâmina própria do estômago, intestino delgado e cólon de indivíduos normais. {Kato M, 1998 #29; HoganSP, 2009 #25}. Existem poucos estudos que tentaram estabelecer qual seria o número considerado normal de eosinófilos na mucosa gastrointestinal na ausência de doença. Embora um estudo tenha analisado amostras de biopsias normais do intestino de adultos relatando um pico de contagem de eosinófilos de 21 células por campo de grande aumento (céls/CGA) em amostras do cólon sigmóide e descendente, outro estudo reportou um pico de 68 céls/CGA no cólon ascendente e de 50 céls/CGA no descendente. Estudos em tecidos normais são escassos, porém a densidade de eosinófilos no cólon direito parece ser maior do que no cólon esquerdo. {Pascal RR, 1997 #30; Polydorides AD, 2008 #31}. O papel dos eosinófilos nos processos inflamatórios ainda não está totalmente elucidado, porém sabemos que eles são capazes de promover a proliferação e ativação de linfócitos, funcionar como células apresentadoras de antígeno, liberar citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, além de atuar na remodelação tecidual {Hogan SP, 2013 #34; Furuta GT, 2005 #147; Coppi LC, 2007 #49}

Em processos alérgicos e inflamatórios caracterizados pela ativação do subgrupo de células T *helper*, os linfócitos Th2, que elaboram citocinas como IL4, IL5 e IL13, proporcionam a formação de anticorpos IgE promovendo o recrutamento, maturação e ativação de eosinófilos e mastócitos. {Rothenberg ME, 2006 #24}. A IL5 é a citocina que possui propriedade regulatória mais potente sobre a proliferação e maturação dos eosinófilos {HoganSP, 2009 #25; Spencer LA, 2010 #200}. Estudos demonstraram a presença destas células em pacientes com DII, tanto na RCU quanto na DC {Dvorak AM, 1993 #26; Furuta GT, 2005 #27; Dubucquoi S, 1995 #33}. Análises da mucosa colônica inflamada de pacientes com RCU evidenciaram ativação e degranulação de eosinófilos. Os resultados dos diversos estudos realizados no contexto da DII não definem se o envolvimento dos eosinófilos é maior na DC ou na RCU {Carvalho AT, 2003 #28; Lampinen M, 2005 #32; Hogan SP, 2013 #34; Coppi LC, 2007 #35}.



3-PROPOSIÇÃO

A incidência das doenças inflamatórias intestinais têm aumentado ao longo das últimas décadas {Shanahana F, 2009 #31}. São doenças que atingem principalmente jovens em idade produtiva levando a um grande prejuízo pessoal e econômico para a sociedade {Loftus EV Jr, 2004 #116; Høivik ML, 2013 #209}. A evolução dos conhecimentos fisiopatológicos e do arsenal terapêutico disponível torna cada vez mais importante o estabelecimento diagnóstico preciso destas doenças. As DII são um grupo heterogêneo e o esforço para identificar subgrupos de comportamento, história natural, complicações e resposta ao tratamento está plenamente justificado. A escolha de terapêuticas apropriadas, decisões cirúrgicas e avaliações do prognóstico destes pacientes dependem fundamentalmente da diferenciação entre DC e RCU. Apesar de todo instrumental diagnóstico disponível atualmente, existem muitos casos em que há dúvida diagnóstica ou o diagnóstico equivocado leva a um grande prejuízo no manejo destes pacientes. A avaliação das características histopatológicas que auxiliem no diagnóstico diferencial e o estabelecimento de padrões imuno-histoquímicos mais objetivos que possam contribuir para o diagnóstico diferencial e minimizar a dificuldade dos patologistas é de suma importância.

Este estudo levanta a hipótese de que os pacientes com RCU tenham um maior número de eosinófilos e de células que expressam CD30 do que pacientes com DC, podendo esta diferença auxiliar no diagnóstico diferencial destas doenças.



4-OBJETIVOS

Objetivos Gerais

Avaliar as características histopatológicas e imuno-histoquímicas no diagnóstico diferencial e na expressão fenotípica da doença de Crohn e da retocolite ulcerativa.

Objetivos específicos

1. Avaliar quais as características histopatológicas que possam auxiliar no diagnóstico diferencial entre DC e RCU.
2. Analisar a expressão do marcador imuno-histoquímico CD30 em pacientes com diagnóstico de doença de Crohn e na retocolite ulcerativa.
3. Avaliar a presença e quantificação dos eosinófilos nos pacientes com DC e RCU
4. Elaborar um escore de pontos que auxilie no diagnóstico diferencial entre DC e RCU.

5- PACIENTES E MÉTODOS

5.1. Local do estudo

Ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais do Serviço de Gastroenterologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

5.2. População do estudo

Avaliação e seleção dos pacientes foram realizadas pelo pesquisador responsável. Foram considerados pacientes com diagnóstico de DC aqueles que apresentavam características inequívocas da doença conforme definido pelos critérios clássicos de Lennard- Jones através de uma combinação de achados clínicos, endoscópicos, histopatológicos e radiológicos {Van Assche G, 2010 #172; Lennard- Jones JE, 1989 #156}. Foram considerados pacientes com RCU aqueles com envolvimento colônico exclusivo, contínuo, na ausência de qualquer característica clínica, endoscópica ou histopatológica que determinasse dúvida diagnóstica.

5.3. Cálculo amostral

O cálculo amostral foi baseado em um projeto piloto (anexo 3). Calculou-se amostra de 49 pacientes em cada grupo de doentes para uma capacidade do marcador CD30 em detectar uma diferença de pelo menos 30% entre os grupos de pacientes com DC e RCU com um poder de 90%. Diante da disponibilidade dos dados completos foram estudados 185 pacientes (105 DC/ 80 RCU).

5.4. Critérios de Exclusão

Impossibilidade de localizar tecido emblocado em parafina.

Pacientes em uso de corticóides, imunossupressores ou agentes biológicos para tratamento das Doenças Inflamatórias Intestinais.

Portadores do vírus HIV.

5.5. Métodos

Foi realizada busca ativa do material de biópsias ou peças cirúrgicas disponíveis no Serviço de Patologia no Hospital de Clínicas de Porto Alegre ou em outros serviços de patologia. Foi utilizado o material disponível com data mais próxima ao diagnóstico da doença em cada paciente, desde que fosse dentro do período de um ano. As biópsias foram coletadas por diversos profissionais durante a rotina assistencial do paciente. Todos os pacientes estavam com processo inflamatório ativo e sem uso de medicações no momento da coleta do material anatomopatológico. A avaliação histopatológica foi feita por um único patologista experiente na área intestinal, acompanhado de um segundo observador em um microscópio de duas cabeças e sem conhecimento prévio do diagnóstico definitivo de cada caso.

5.6. Variáveis

5.6.a. Dados demográficos:

Todas as informações clínicas foram obtidas através de entrevista com os pacientes durante a primeira avaliação e seguimento ambulatorial. Idade do paciente no momento do diagnóstico, sexo, extensão, localização e comportamento das doenças, manifestações extra-intestinais e medicações usadas pelo paciente no momento da coleta do material histopatológico.

5.6.b. Características Histopatológicas:

As variáveis histopatológicas avaliadas foram baseadas nas recomendações da Diretriz Britânica publicada em 1997 {Jenkins D, 1997 #21} e estão descritas abaixo:

1. Alteração na arquitetura da mucosa: modificação na topografia da superfície, diminuição na densidade de criptas, alteração na arquitetura das criptas (distorção, ramificação ou atrofia);
2. Celularidade da lâmina própria: aumento e redistribuição dos tipos celulares usualmente presentes, presença de granulomas ou células gigantes;
3. Avaliação da infiltração de polimorfonucleares (PMN) na lâmina própria, no epitélio das criptas (criptite) e no lúmen das criptas (abscessos crípticos);
4. Anormalidades epiteliais: depleção de mucina, dano à superfície epitelial, mudanças metaplásicas, linfócitos intraepiteliais, apoptose e depósito de colágeno subepitelial.

A presença de infiltração de PMN, criptite, abscessos crípticos, erosões e ulcerações foram considerados sinais de atividade inflamatória. As alterações na arquitetura da mucosa como distorção e ramificação glandular, e metaplasia das células de Paneth (quando presentes no cólon esquerdo), foram consideradas como indicativos de dano crônico.

Para a contagem de eosinófilos, a área de maior densidade eosinofílica foi selecionada com óptica de aumento médio (100x), considerando-se a contagem absoluta em grande aumento (400x = 500 μ).

Todos os fragmentos de cada paciente foram avaliados, elegendo-se as amostras de biópsia do segmento mais alterado e com maior densidade de células para posterior análise imuno-histoquímica.

Os parâmetros analisados e que apresentaram diferença estatística significativa estão listadas abaixo:

1. extensão do processo inflamatório para a submucosa;
2. presença de granuloma na lâmina própria ou submucosa, portanto não associado à ruptura de células do epitélio criptoglandular;
3. variabilidade de acometimento entre os fragmentos que caracteriza a presença ou ausência de uniformidade do processo inflamatório
4. Presença de erosão aftóide;

5. contagem do número absoluto dos eosinófilos no segmento mais afetado em óptica de 400x (cada campo de grande aumento no microscópio utilizado corresponde a 500 μ);
6. soma da contagem absoluta de células marcadas pelo CD30 em 10 campos de grande aumento (400x), no segmento mais alterado.

5.5.c. Marcadores imuno-histoquímicos:

A imuno-histoquímica para o marcador CD30 foi avaliada através da contagem absoluta somando-se as células marcadas em 10 campos consecutivos de grande aumento (400x). O anticorpo utilizado foi da marca abcam (ab 23766, diluição 1:100).

5.5.d. Financiamento

A verba orçamentária deste projeto foi custeada pelo somatório de recursos do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, complementada com recursos próprios da aluna.

5.6. Considerações éticas

Os pacientes foram informados sobre a forma, o curso e objetivo da pesquisa. O médico pesquisador ofereceu aos pacientes a oportunidade de participar do estudo. No caso de concordância em participar, foi anotado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido em formulário especial e validado através de assinatura. Nenhum paciente foi submetido a colonoscopia com biópsias apenas para ser incluído no estudo, mas por necessidade de diagnóstico, acompanhamento ou tomada de decisão terapêutica. Foi

respeitada a recusa do paciente, sem qualquer prejuízo ao seu acompanhamento clínico e tratamento habitual. Projeto aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisa do HCPA (GPPG 07-310).

5.7. Análise estatística

As variáveis contínuas foram descritas por média e desvio padrão ou mediana e amplitude interquartilica. As variáveis categóricas foram descritas por frequências absolutas e relativas.

Dados contínuos foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e aqueles com distribuição assimétrica foram comparados por testes não-paramétricos.

Na comparação de variáveis contínuas com distribuição simétrica, o teste t-Student para amostras independentes foi aplicado. Em caso de assimetria, o teste de Mann-Whitney foi utilizado.

O teste qui-quadrado de Pearson ou exato de Fisher foram utilizados para comparação de proporções entre os grupos. Para complementar essas análises, o teste dos resíduos ajustados foi aplicado.

As variáveis histopatológicas com potencial discriminatório foram analisadas, aquelas que apresentaram diferença estatística demonstrando associação, foram utilizadas na construção de um escore diagnóstico.

Para determinar os pontos de corte do CD30 e do escore diagnóstico de doença de Crohn considerando as doenças como padrão-ouro, a curva *Receiver Operating Characteristic* (ROC) foi realizada. Foram calculadas as estatísticas de sensibilidade, especificidade, razão de verossimilhança positiva e negativa e a área sob a curva para os pontos de corte das variáveis.

O nível de significância estatística foi de 5% ($p \leq 0,05$) e as análises foram realizadas pelo programa SPSS versão 18.0.

6- RESULTADOS

Nos pacientes com DC (105 pacientes), a média de idade por ocasião do diagnóstico foi de 32,4 anos (14-64, SD \pm 13,1) e nos pacientes com RCU (80 pacientes), foi de 39,1 anos (17-69, SD \pm 13,4). Não houve diferença na prevalência em relação ao sexo em nenhuma das duas doenças, sendo do sexo masculino 51,4% dos pacientes com DC e 48,8% com RCU.

Na RCU, aproximadamente metade dos pacientes (49,4 %) apresentou-se com colite extensa, 32 (40,5%) com colite esquerda e, apenas 8 (10,1%) com proctite. Quanto à localização, os pacientes com DC apresentaram doença apenas no íleo terminal em 33 (31,7%), exclusivamente no cólon em 35 (33,7%), e 30 (28,8%) na região íleocolônica. No momento do diagnóstico, o padrão inflamatório predominava em 53 pacientes (50,5%), o estenosante em 39 (37,1%), e o penetrante em 13 (12,4%). A doença perianal já estava presente, na primeira avaliação, em 33 pacientes (31,4%). As manifestações extra-intestinais foram mais frequentes nos pacientes com DC (44 pacientes - 41,9%) do que naqueles com RCU (18 pacientes - 22,5%). A caracterização da população estudada está apresentada na tabela 1.

As associações de cada característica histopatológica com cada doença foram avaliadas. Aquelas que apresentaram diferença estatisticamente significativa estão demonstradas na Tabela 2. Estudando todas as variáveis conjuntamente, chegamos a uma acurácia (proporção de acertos, ou seja, o total de verdadeiros positivos e negativos) de 69,1% no diagnóstico diferencial entre DC e RCU.

Tabela 1. Caracterização da população estudada

Variáveis	DC n=105 (%)	RCU n=80 (%)	p
Idade no diagnóstico (anos) – média ± DP	32,4 ± 13,1	39,1 ± 13,4	0,001
Sexo – n(%)			0,832
Masculino	54 (51,4)	39 (48,8)	
Feminino	51 (48,6)	41 (51,3)	
Extensão RCU – n(%)			-
Proctite	-	8 (10,1)	
Cólon E	-	32 (40,5)	
Colite extensa	-	39 (49,4)	
Localização DC* – n(%)			-
Íleo terminal	33 (31,7)	-	
Cólon	35 (33,7)	-	
Íleocolônica	30 (28,8)	-	
L1 + L4	4 (3,8)	-	
L2 + L4	2 (1,9)	-	
Doença Perianal – n(%)			-
Sim	33 (31,4)	-	
Não	72 (68,6)	-	
Comportamento – n(%)			-
Ñ penetrante/ñ estenosante	53 (50,5)	-	
Estenosante	39 (37,1)	-	
Penetrante	13 (12,4)	-	
Manifestações EI – n(%)			0,009
Sim	44 (41,9)	18 (22,5)	
Não	61 (58,1)	62 (77,5)	

*L1- ÍLEO TERMINAL; L2- COLÔNICA; L3- ILEOCOLÔNICA; L4- TGI SUPERIOR

Tabela 2 – Variáveis histopatológicas com capacidade de auxiliar no diagnóstico diferencial entre DC e RCU

Variáveis	DC n=105 (%)	RCU n=80 (%)	p
Aspectos histopatológicos – n(%)			
Extensão para submucosa	47 (44,3)	3 (3,8)	<0,001
Granuloma	36 (34,0)	0 (0,0)	<0,001
Variabilidade	87 (82,1)	12 (15,2)	<0,001
Erosão aftoide	35 (33,0)	5 (6,3)	<0,001

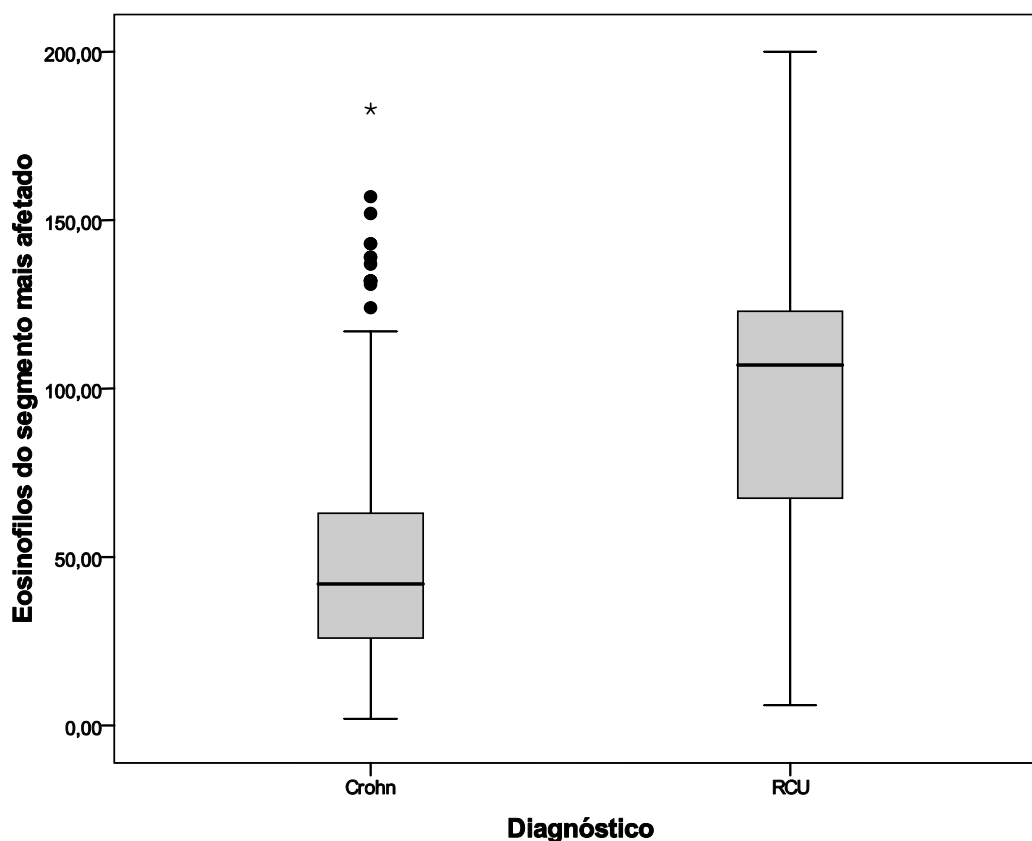
Na tabela 3 são apresentadas as medianas da soma da contagem de eosinófilos em cada segmento biopsiado em pacientes com DC e RCU avaliado pela óptica de maior aumento e suas medidas interquartílicas. Considerando-se as áreas de cólon e reto, fica evidente o predomínio de eosinófilos na RCU, sendo significativamente maior em todos os segmentos. Assumindo como ponto de corte 70 eosinófilos ou mais, encontra-se uma sensibilidade de 78,3% e uma especificidade de 71,0% para o diagnóstico de RCU, a área sob a curva foi de 0,767 (IC 95%: 0,696–0,838).

Tabela 3. Avaliação quantitativa dos eosinófilos (mediana e percentis) por segmento e na biópsia mais alterada.

Variável	N de Amostras Na DC	DC	N de Amostras na RCU	RCU	p
Eosinófilos – mediana (P25 – P75)					
Íleo	77	32 (14 – 57)	10	15 (13 – 24)	0,072
Cólon D	80	29 (15 – 44)	43	50 (22 – 85)	0,016
Cólon E	84	18 (10 – 37)	78	84,5 (44 – 116)	<0,001
Reto	43	31 (6 – 48,3)	54	94,5 (54 – 118)	<0,001
Segmento mais alterado	105	42 (25,5 – 63,5)	80	107 (67 – 123)	<0,001

O gráfico 1 demonstra a diferença da mediana do número de eosinófilos no segmento mais afetado do grupo da RCU e da DC.

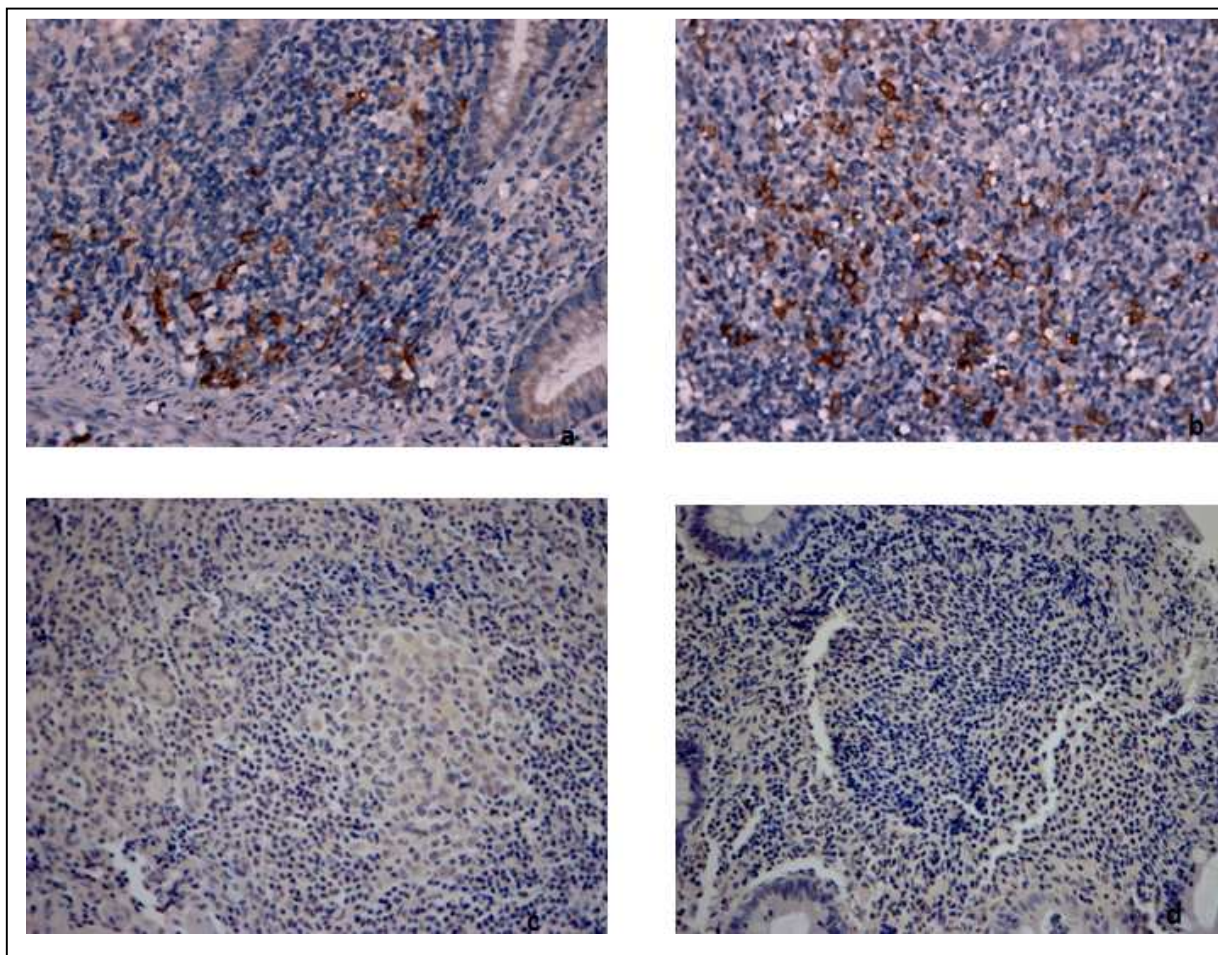
Gráfico 1. Mediana de eosinófilos na DC e na RCU no segmento mais afetado



Mediana na DC 42 (25,5 –63,5) e na RCU 107 (67 – 123), $p < 0,001$

Ao avaliar a marcação imuno-histoquímica de células $CD30^+$ evidencia-se uma mediana de 3 (2-6) na DC e de 33 (24-52) na RCU. Fica demonstrado o predomínio estatisticamente significativo destas células nos pacientes com RCU. Além disso, ao observar as células $CD30^+$ foi possível perceber dois padrões de distribuição, um padrão difuso e outro em agrupamentos nos centros dos folículos linfoides (Figura 4). A distribuição em agrupamentos foi mais frequente e com diferença estatística significativamente maior nos casos de RCU (Tabela 4).

Figura 4. Imuno-histoquímica CD30 figuras superiores (a e b) correspondem a casos de RCU e figuras inferiores (c e d) correspondem a casos de DC.



a. e b. casos de RCU CD30+

c. e d. casos de DC CD30-

Tabela 4. Avaliação quantitativa e padrão de distribuição do marcador CD30 no segmento mais alterado.

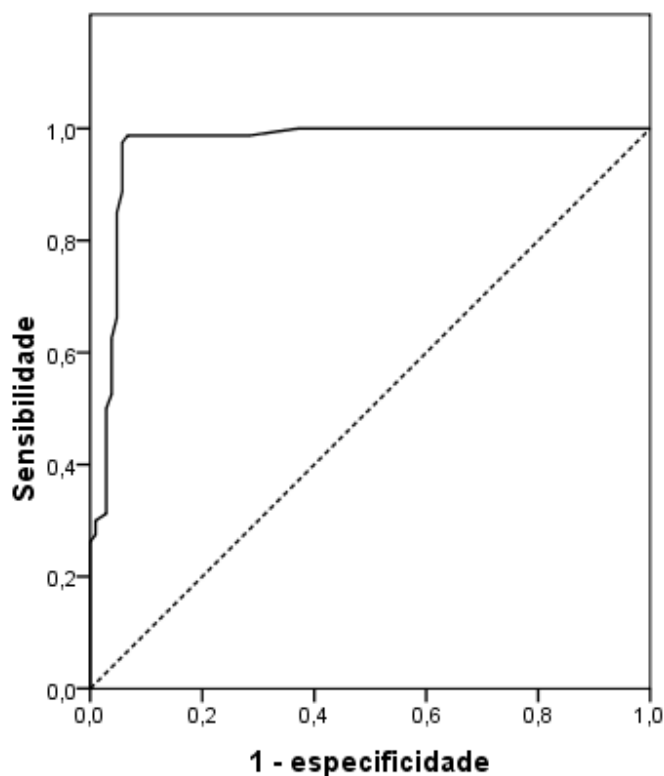
Variáveis	DC n=105	RCU n=80	p
CD30 – mediana (P25 - P75)	3 (2 – 6)	33 (24 – 52)	<0,001
Distribuição – n(%)			<0,001
Agrupamento	18 (17,0)	53 (67,1)**	
Difuso	81 (76,4)**	11 (13,9)	
Agrupamento + Difuso	3 (2,8)	15 (19,0)**	
Nada	4 (3,8)	0 (0,0)	

** associação estatisticamente significativa pelo teste dos resíduos ajustados a 5% de significância

Estabelecendo-se o ponto de corte de 15 ou mais células marcadas com CD30, encontra-se uma sensibilidade de 97,5% e uma especificidade de 94,3% para o diagnóstico de RCU, a área sob a curva foi de 0,967 (IC95%: 0,941–0,993).

(gráfico 2). Razão de verossimilhança positiva de 17,1.

Gráfico 2 – Curva ROC para determinar o ponto de corte do CD30 para diagnóstico de RCU



O ponto de corte determinado pela curva ROC foi de 15 (S=97,5%; E=94,3%; RV+=17,1; RV-=0,03; área sob a curva: 0,967; IC95%: 0,941 – 0,993).

A análise evidenciou que eosinófilos, células CD30⁺ e seu padrão de distribuição, extensão do processo inflamatório para submucosa, presença de granuloma, erosão aftoide e variabilidade de acometimento entre os fragmentos estudados possuíam capacidade discriminatória para o diagnóstico de DC e RCU. Diante destes resultados, foram atribuídos valores a cada variável, baseando-se no poder estatístico de cada uma delas, de forma a totalizar uma soma de 10 pontos para construção de um escore histopatológico para o diagnóstico da DC, apresentado na tabela 5.

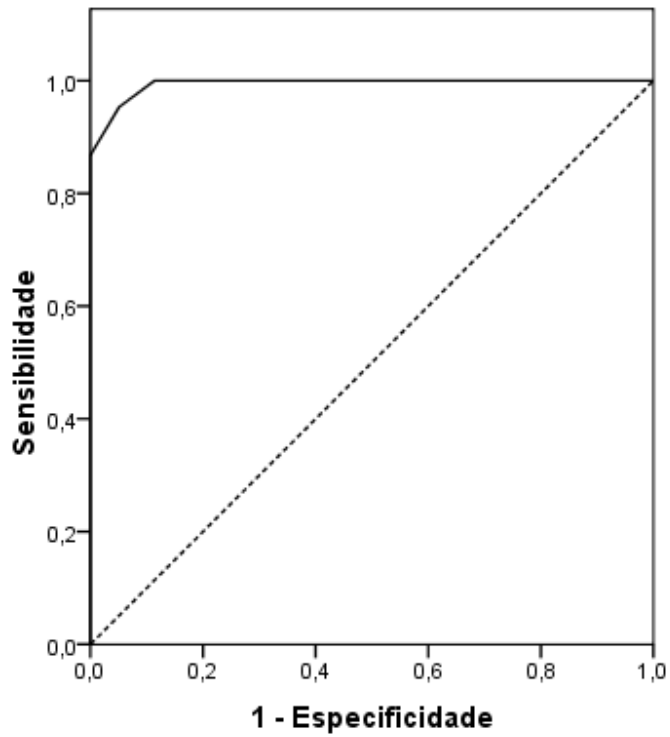
Tabela 5 – Escore histopatológico para o diagnóstico da doença de Crohn

Variáveis	Ponto de corte	Pontos
Eosinófilos do segmento mais afetado	< 70	2
CD30 do segmento mais afetado	<15	2
Distribuição difusa do CD30	-	1
Inflamação na submucosa	-	1
Presença de granuloma	-	2
Variabilidade de acometimento entre os fragmentos	-	1
Erosão aftoide	-	1

Aplicando-se o escore diagnóstico histopatológico para DC, se o resultado da soma das variáveis for maior ou igual a 5 atingimos uma especificidade de 100% e uma sensibilidade de 86.8% (Gráfico 3). Assim, a razão de verossimilhança positiva tende ao infinito. Ao considerarmos o ponto de corte a soma de 4 pontos no escore elevamos a sensibilidade para 95,3%, e reduzimos a especificidade de 100% para 94,9%.

Se excluídos os pacientes com DC em que o segmento mais afetado era o íleo, o tamanho amostral permanece acima do calculado e os resultados mantêm-se semelhantes. Em relação à curva ROC, os pontos de corte permanecem os mesmos. Quanto ao CD-30 a mediana do grupo com DC foi de 2 (percentis 25 e 75 de 1 e 6, respectivamente) e no grupo RCU foi de 33 (percentis 25 e 75 de 24 e 52, respectivamente), com $p < 0,001$.

Gráfico 3 – Curva ROC para determinar o ponto de corte do escore para diagnóstico de Crohn



O ponto de corte determinado pela curva ROC foi de 5 (S=86,8%; E=100%; $RV+=\infty$; $RV-=0,13$; área sob a curva: 0,994; IC95%: 0,988 – 1,000).



7- DISCUSSÃO

O principal objetivo deste estudo foi avaliar as características histopatológicas e a relevância da presença eosinófilos e células CD30 positivas por imuno-histoquímica no diagnóstico da doença de Crohn e da retocolite ulcerativa. Sabe-se que não há um teste considerado padrão para o diagnóstico das DII. Na ausência de um teste padrão, considera-se como um dos pontos fortes deste estudo o fato de utilizar o diagnóstico de certeza baseado no conjunto de critérios clássicos, consolidado pelo acompanhamento da evolução dos pacientes.

Este estudo foi realizado com um grupo de pacientes em um hospital terciário de referência para DII, porém quando vamos comparar a extensão da RCU e a localização da DC nos pacientes estudados com os achados da literatura, há uma relativa semelhança. No estudo IBSEN {Henriksen M, 2006 #191}, 27% dos pacientes apresentavam proctite no diagnóstico, 38% colite esquerda e 35% pancolite. Na nossa amostra, 10,1% apresentaram-se com proctite ao diagnóstico, 40,5% com colite esquerda e 49,4% com pancolite. O maior número de casos de pancolite e menor de proctites, quando comparado aos estudos populacionais deve-se, provavelmente, a uma concentração de casos mais selecionados e de difícil tratamento em um hospital de referência. A localização da DC em três coortes populacionais {Henriksen M, 2007 #193; Gollop JH, 1988 #192; Wolters FL, 2006 #194} demonstra uma distribuição semelhante à deste estudo. No estudo Gollop a localização foi de ileíte pura 35%, colite pura 36% e ileocolite 29%; 15% de ileíte, 42% de colite, 37% de ileocolite com 6% de prevalência no comprometimento do trato digestivo superior no estudo de Wolters e col.; já no estudo de Henriksen et al houve 25% de doença ileal, 45% de colite pura, 26% de ileocolite com 4% dos pacientes apresentando comprometimento alto. No quadro abaixo (quadro 5), são comparados os achados da literatura com a amostra estudada.

A média de idade do diagnóstico demonstra uma prevalência maior da DC em uma população mais jovem quando comparada a da RCU, estes achados se assemelham aos de outros autores importantes {Dignass A, 2012 #144; Van Assche G, 2010 #1}.

Quadro 5 - Comparação da localização da doença de Crohn do estudo atual com os achados da literatura

Localização DC	Estudo atual (%)	Gollop, 1988 (%)	Wolters, 2006 (%)	Henriksen, 2007 (%)
Íleo terminal	35,2	35	15	25
Cólon	35,2	36	42	45
Íleocolônica	28,6	29	37	26
TGI alto	5,7	-	6	4

Este estudo mostra que, no momento do diagnóstico, 50,5% dos pacientes apresentavam comportamento não penetrante e não estenosante (inflamatório), 37,1% estenosante e 12,4% penetrante. O clássico estudo de Cosnes e colaboradores apresenta um índice acima de 80% de comportamento inflamatório no diagnóstico, esta diferença em relação aos nossos achados talvez reflita um diagnóstico mais tardio na nossa população. Outra observação interessante, é que na população estudada a complicação mais prevalente foi a estenosante ao contrário do estudo de Cosnes que evidencia um maior número de complicações penetrantes {Cosnes J, 2002 #134}, devendo-se considerar uma diferença de fenótipos relacionada à diversidade populacional. A ocorrência de lesões perianais, geralmente sinaliza um fenótipo mais agressivo da doença. Na literatura, a frequência de lesões perianais ao diagnóstico varia de 10 a 37% {Van Assche G, 2010 #172; Schwartz DA, 2002 #210; Cosnes J, 2002 #134}. No presente estudo, aproximadamente 30% dos pacientes apresentavam doença perianal ao diagnóstico.

Distinguir um processo inflamatório crônico de um agudo não oferece maior dificuldade aos patologistas em geral. No entanto, a diferenciação entre RCU e DC parece ser tarefa difícil para os patologistas especialistas em tubo digestivo, e ainda mais para os generalistas. Esta dificuldade é que tem motivado muitos autores a realizarem estudos, com diferentes abordagens e modelos, na tentativa de melhorar o desempenho do diagnóstico histopatológico. Muitas são as características histopatológicas recomendadas para avaliação do diagnóstico das DII {Jenkins D, 1997

#21; Bentley E, 2002 #100}, porém uma vez determinados os achados que caracterizam um acometimento crônico (distorção glandular, irregularidade da superfície epitelial e metaplasia das células de Paneth), devemos utilizar critérios mais específicos que possam nos auxiliar no diagnóstico da DC e da RCU {Cross SS, 2002 #51; Dube AK, 1998 #35}. As variáveis sugeridas na literatura, que podem favorecer o diagnóstico de RCU, são: intensa distorção da arquitetura das criptas, presença de inflamação difusa e redução na densidade das criptas e de mucina. As características consideradas para favorecer o diagnóstico da DC são a presença de granulomas epitelioides, inflamação e distorção glandular focal. A maioria das variáveis histopatológicas avaliadas possui um grau importante de subjetividade, haja vista a variabilidade interobservadores encontrada na literatura. Cross et al aplicando o modelo de regressão logística e um sistema computadorizado com as características histopatológicas codificadas não conseguiram uma sensibilidade maior do que 84% e uma especificidade de 79% para o diagnóstico de RCU {Cross SS, 2002 #51}. Existem basicamente dois tipos de estudos realizados para avaliar o grau de acurácia dos parâmetros histopatológicos no diagnóstico diferencial entre DC e RCU. Os estudos realizados através da auditoria de um grande número de casos não selecionados e os estudos de avaliação da variabilidade interobservadores. Um estudo de auditoria {Dube AK, 1998 #35}, realizado em um grande hospital universitário, que parece refletir um cenário mais próximo ao da prática real do dia a dia, utilizou os critérios sugeridos pela diretriz britânica {Jenkins D, 1997 #21}. Ao avaliar as biópsias com atividade inflamatória e com diagnóstico sugestivo de DII, os autores conseguiram uma sensibilidade de 74% para o diagnóstico de DC e RCU. Um grande problema encontrado neste e em outros estudos, bem como na prática diária, é a ausência de uma nomenclatura padronizada nos relatórios histopatológicos. Outro estudo {Frei JV, 1981 #197}, que incluiu biópsias com e sem atividade inflamatória e em momentos variados na história da evolução dos pacientes e com relatórios não categorizados em diagnóstico “sugestivo” ou “altamente sugestivo”, encontrou uma sensibilidade de 40% para o diagnóstico de DC e de 70% para RCU. Os dados derivados de estudos interobservadores ou em uma análise quantitativa através de imagens não podem ser diretamente comparados, pois tendem a utilizar uma amostragem mais selecionada.

Nestes estudos, foi encontrada uma sensibilidade diagnóstica que varia de 70% a 82% para RCU e de 40% a 77% para DC {Thompson EM, 1985 #198; Seldenrijk CA, 1991 #129}.

No presente estudo, todas as variáveis descritas, exceto a presença de granuloma, acabam por expressar a mesma questão, a de que a RCU é uma doença difusa e a DC é uma doença mais focal. Por esta razão, agrupamos estes achados sob a denominação de “variabilidade de acometimento entre os fragmentos” na tentativa de facilitar a objetividade. Já foi bem demonstrado que a avaliação de apenas 2 fragmentos comparados à avaliação de um número maior de biópsias, incluindo áreas de mucosa endoscopicamente normal, proporciona uma menor acurácia no diagnóstico {Dejaco C, 2003 #123; Bentley E, 2002 #100}. Assim, ressalta-se a importância de analisar vários fragmentos de biópsia de regiões distintas e identificadas em frascos separados para cada segmento. No estudo atual, a acurácia atingida, utilizando-se apenas as 4 variáveis histopatológicas com diferença estatística significativa entre as duas doenças, foi de 69,1%, número muito aquém do desejado, porém não distante ao da literatura citada.

Sabe-se que os eosinófilos são células pró-inflamatórias que participam no processo inflamatório das DII, estando presentes em maior número na mucosa destes pacientes {Carvalho AT, 2003 #142; Bischoff SC, 1996 #87; Lampinen M, 2008 #30}. Estudos sobre o número e ativação dos eosinófilos na DII revelam resultados controversos {Lampinen M, 2008 #30; Bischoff SC, 1996 #87; Bischoff SC, 1996 #87; Coppi LC, 2007 #49}. Isto pode ser explicado pelo fato de que estes estudos analisaram conjuntamente pacientes em diferentes momentos da doença (atividade e remissão), muitos já sob o efeito de medicações, utilizando amostras pequenas e técnicas diferentes. A amostra do nosso estudo é muito mais homogênea, sendo que todas as biópsias foram coletadas no início da doença e sem influência medicamentosa. Como a IL-5 é uma das principais citocinas que agem no recrutamento de eosinófilos e está envolvida na rota de ativação dos linfócitos Th2 {Dubucquoi S, 1995 #145; Hogan SP, 2013 #150; Wedemeyer J, 2008 #199; Spencer LA, 2010 #200}, nada mais natural do que imaginarmos uma maior concentração destas células na RCU do que na DC. Achado bem evidenciado em todos os segmentos do cólon pelo presente estudo.

O CD30 é um receptor de citocinas transmembrana utilizado com frequência na caracterização de neoplasias hematológicas, como o linfoma de Hodgkin {de Bruin PC, 1995 #201}. Estudos demonstraram que ele também é expresso na membrana de alguns linfócitos ativados, não neoplásicos, pertencentes à linhagem Th2 {D'Elis MM, 1997 #45; Giacomelli R, 1998 #40}. Baseado neste conhecimento, esperava-se que o CD30 estivesse expresso mais frequentemente nas células inflamatórias na RCU. Ao revisar a literatura, não encontramos nenhum estudo que tenha utilizado este marcador imuno-histoquímico com o intuito de avaliar seu potencial no diagnóstico diferencial das DII. Nosso estudo demonstra claramente o predomínio de células marcadas pelo CD30 nas biópsias dos pacientes com RCU, sendo a mediana de 33 células marcadas, quando comparado com a mediana de 3 células nos pacientes com DC. Tais achados revelam uma sensibilidade de 97,5% e uma especificidade 94,3%, determinado por um ponto de corte de 15 células marcadas, para o diagnóstico diferencial das DII.

A literatura parece ter esgotado em si a possibilidade de melhorar o desempenho diagnóstico com os parâmetros que dispomos. Na realidade, sabe-se que existem casos em que não é vista nenhuma característica histopatológica capaz de discernir entre DC e RCU {Bentley E, 2002 #100; Geboes K, 2008 #104; Absar S, 2006 #101}. O atual estudo demonstra que ao agregarmos a contagem de eosinófilos (de fácil visualização e identificação pela coloração rotineira de HE), e a marcação de células CD30 por imuno-histoquímica, conseguimos alcançar uma alta sensibilidade e especificidade diagnósticas com metodologia simples e de baixo custo. Além disso, foi possível a construção de um escore diagnóstico através de um trabalho conjunto entre um patologista e um gastroenterologista, que nos parece de fácil utilização na rotina dos serviços de patologia, e que contribui ao proporcionar maior especificidade (CD30 – E= 94,3% versus Escore – E= 100%).

Não se pode deixar de ressaltar que a utilização da avaliação rotineira das características histopatológicas associadas à avaliação imuno-histoquímica com CD30 já proporciona alto grau de sensibilidade e especificidade no diagnóstico diferencial. Podemos então, considerar a utilização do escore nos casos em que uma especificidade maior é o dado mais necessário para tomada de decisão terapêutica em um determinado paciente.

Os dados aqui apresentados demonstram a relevância dos eosinófilos e do marcador imuno-histoquímico CD30 para o diagnóstico diferencial das DII proporcionando um ganho significativo na sensibilidade e especificidade diagnósticas. A construção de um escore diagnóstico simples e objetivo, pode contribuir para avaliação do material de biópsias dos pacientes com DII, tanto por patologistas especialistas, quanto generalistas. Os próximos passos parecem ser a validação deste escore em um estudo prospectivo. Além de avaliar se estes resultados são reprodutíveis ao utilizar os mesmos critérios em pacientes que já estão em tratamento para DII.



8- CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que:

1. Foi possível identificar 4 características histopatológicas que podem efetivamente auxiliar no diagnóstico diferencial das DII.
2. A contagem de eosinófilos e a expressão do marcador imuno-histoquímico CD30 são relevantes no diagnóstico diferencial entre a doença de Crohn e a retocolite ulcerativa.
3. Através dos resultados deste estudo foi possível elaborar um escore de pontos com alta especificidade para o diagnóstico diferencial entre DC e RCU.



9- BIBLIOGRAFIA

- Abraham C and C. J. (2009). "Interleukin-23/Th17 Pathways and Inflammatory Bowel Disease." Inflamm Bowel Dis **15**(7): 1090-100.
- Abreu MT, H. N. (2007). "Diagnosis of Colitis: Making the Initial Diagnosis." Clin Gastroenterol and Hepatol **5**: 295–301
- Absar S, Mason J, et al. (2006). "A new combined form significantly improves accuracy of pathological diagnosis in inflammatory bowel disease in absence of the clinicopathological conference." Tech Coloproctol **10**: 227-232.
- Annunziato F, Cosmi L, et al. (1999). "Assessment of chemokine receptor expression by human Th1 and Th2 cells in vitro and in vivo." J. Leukoc. Biol. **65**: 691–699.
- Bamias G and Cominelli F. (2007). "Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease: current concepts." Curr Opin Gastroenterol **23**: 365–369.
- Bamias G, Martin III C, et al. (2005). "Proinflammatory Effects of TH2 Cytokines in a Murine Model of Chronic Small Intestinal Inflammation." Gastroenterol **128**: 654–666
- Bataille F, Klebl F, et al. (2003). "Histopathological parameters as predictors for the course of Crohn's disease." Virchows Arch **443**: 501-507.
- Bentley E, Jenkins D, et al. (2002). "How could pathologists improve the initial diagnosis of colitis? Evidence from an international workshop." J. Clin. Pathol. **55**: 955-960
- Bischoff SC, Wedemeyer J, et al. (1996). "Quantitative assessment of intestinal eosinophils and mast cells in inflammatory bowel disease." Histopathol **28**: 1-13.
- Brand S. (2009). "Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease." Gut **58**(8): 1152-67.
- Camoglio L, T. V. A., Tigges AJ, Das PK, Van Deventer SJ. (1998). "Altered expression of interferon-gamma and interleukin-4 in inflammatory bowel disease." Inflamm Bowel Dis **4**(4): 285-90.
- Carpenter HA and T. NJ. (2000). "The Importance of Clinicopathological Correlation in the Diagnosis of Inflammatory Conditions of the Colon: Histological Patterns With Clinical Implications." Am J Gastroenterol **95**: 878–896.
- Carvalho AT, E. C., de Souza HS, et al. (2003). "Immunohistochemical study of intestinal eosinophils in inflammatory bowel disease." J Clin Gastroenterol **36**(2): 120-5.
- Christophi GP, R. R., Holtzapple PG, Massa PT, Landas SK. (2012). "Immune markers and differential signaling networks in ulcerative colitis and Crohn's disease." Inflamm Bowel Dis **18**(12): 2342-56.
- Coppi LC, T. S., de Ayrizono ML, Coy CS, Fagundes WJ, Goes JR, Franchi GC Jr, Nowill AE, Montes CG, Antunes E, Ferraz JG. (2007). "Comparative study of eosinophil chemotaxis, adhesion, and degranulation in vitro in ulcerative colitis and Crohn's disease." Inflamm Bowel Dis **13**(2): 211-8.
- Cornaggia M, L. M., Mescolic C, Sturniolo GC, Gullotta R. (2011). "Chronic idiopathic inflammatory bowel diseases: The histology report." Digestive and Liver Disease **43S** S293–S303.
- Cosnes JCS, Blain A, Beaugerie L, et al. (2002). "Long-Term Evolution of Disease Behavior of Crohn's Disease." Inflamm Bowel Dis **8**(4): 244-250.

- Cross SS and Harisson RF. (2002). "Discriminant histological features in the diagnosis of chronic idiopathic inflammatory bowel disease: analysis of a large dataset by a novel data visualisation technique." J Clin Pathol **55**: 51-57.
- D'Elcios MM, Romagnani P, et al. (1997). "In vivo CD30 expression in human diseases with predominant activation of Th2-like T cells." J. Leukoc.Biol. **61**: 539-544.
- Danese S and G. A. (2005). "Chemokines in inflammatory bowel disease." J. Clin. Pathol. **58**: 1025-1027
- de Bruin PC, Gruss H, van der Valk P, Willemze R, Meijer CJ. (1995). "CD30 expression in normal and neoplastic lymphoid tissue: biological aspects and clinical implications." Leukemia **9**: 1620-7.
- Dejaco COC, Angelberger S, et al. (2003). "Diagnosing colitis: a prospective study on essential parameters for reaching a diagnosis." Endoscopy **35**(12): 1004-1008.
- Di Sabatino A, Biancheri P, Rovedatti L, MacDonald TT, Corazza GR. (2012). "New pathogenic paradigms in inflammatory bowel disease." Inflamm Bowel Dis **18**(2): 368-71.
- Dignass AER, Magro F, Maaser C, Chowers Y, Geboes K, et al. (2012). "Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis Part 1: Definitions and diagnosis." J Crohn's Colitis **6**(10): 965-990.
- Dube AK, Cross SS, et al. (1998). "Audit of the histopathological diagnosis of non-neoplastic colorectal biopsies: achievable standards for the diagnosis of inflammatory bowel disease." J. Clin. Pathol. **51**: 378-381.
- Dubucquoi SJA, Klein O, Desremaux P, Quandalle P, Cortot A, Capron M, Colombel JF (1995). "Activated eosinophils and interleukin 5 expression in early recurrence of Crohn's disease. ." Gut **37**: 242-246.
- Dvorak AM, Onderdonk A, McLeod RS, et al. (1993). "Ultrastructural identification of exocytosis of granules from human gut eosinophils in vivo. ." Int Arch Allergy Immunol **102**(1): 33-45.
- Etchevers MJ, Aceituno M, García-Bosch O, Ordás I, et al. (2009). "Risk Factors and Characteristics of Extent Progression in Ulcerative Colitis." Inflamm Bowel Dis **15**(9): 1320 –1325.
- Farmer M, Petras RE, et al. (2000). "The Importance of Diagnostic Accuracy in Colonic Inflammatory Bowel Disease." Am J Gastroenterol **95**: 3184 –3188.
- Finkelstein SD, Sasatomi E, et al. (2002). "Pathologic features of early inflammatory bowel disease." Gastroenterol Clin N Am **31**: 133-145.
- Frei JV, Morson BC. (1981). "Medical audit of rectal biopsy diagnosis of inflammatory bowel disease." J Clin Pathol **35**: 341-4.
- Fujino S, Andoh A, et al. (2003). "Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease." Gut **52**: 65-70.
- Furuta GT, Nieuwenhuis EE, Karhausen J, et al. (2005). "Eosinophils alter colonic epithelial barrier function: role for major basic protein". Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **289**: 890–7.
- Fuss I, et al. (2004). "Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis." J. Clin. Invest. **113**: 1490-1497.
- Fuss IJ. (2008). "Is the Th1/Th2 paradigm of immune regulation applicable to IBD?" Inflamm Bowel Dis **14**(suppl2): S110-2.

- Gasche C, Grundtner P. (2005). "Genotypes and phenotypes in Crohn's disease: do they help in clinical management?" Gut **54**: 162-167.
- Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, D'Haens G, Hanauer SB, Irvine EJ, et al. (2000). "A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998." Inflamm Bowel Dis **6**(1): 8-15.
- Geboes K (2008). "What Histologic Features Best Differentiate Crohn's Disease from Ulcerative Colitis?" Inflamm Bowel Dis **14**(S2): S168-S169.
- Geboes K, Dalle I. (2002). "Influence of treatment on morphological features of mucosal inflammation." Gut **50** (Suppl III): iii37-iii42
- Geboes K, Van Eyken P. (2009). "Inflammatory bowel disease unclassified and indeterminate colitis: the role of the pathologist." J. Clin. Pathol. **62**: 201-205.
- Geboes K, Villanacci V. (2005). "Terminology for the diagnosis of colitis." J. Clin. Pathol. **58**: 1133-1134
- Giacomelli R, Passacantando A, et al. (1998). "Serum levels soluble CD30 are increased in ulcerative colitis (UC) but not in Crohn's disease (CD)." Clin Exp Immunol **111**: 532-535.
- Goldman H (1994). "Interpretation of Large Intestinal Mucosal Biopsy Specimens." Hum Pathol **25**: 1150- 1159.
- Gollop JH , Phillips SF , Melton III LJ et al. (1988). "Epidemiologic aspects of Crohn's disease: a population based study in Olmsted County, Minnesota, 1943 – 1982 . Gut 1988 ; 29 : 49 – 56 ." Gut **29**: 49-56.
- Guindi M, Riddell RH. (2004). "Indeterminate colitis." J. Clin. Pathol. **57**: 1233-1244
- Hanauer SB (2006). "Inflammatory Bowel Disease: Epidemiology, Pathogenesis, and Therapeutic Opportunities." Inflamm Bowel Dis **12**: S3–S9.
- Heller F, Florian P, et al. (2005). "Interleukin-13 Is the Key Effector Th2 Cytokine in Ulcerative Colitis That Affects Epithelial Tight Junctions, Apoptosis, and Cell Restitution." Gastroenterol **129**: 550–564
- Heller F, Florian P, et al. (2005). "Interleukin-13 Is the Key Effector Th2 Cytokine in Ulcerative Colitis That Affects Epithelial Tight Junctions, Apoptosis, and Cell Restitution." Gastroenterol **129**: 550–564
- Henriksen M , Jahnsen J , Lygren I et al. (2007). "Clinical course in Crohn's disease: results of a five-year population-based follow-up study (the IBSEN study) . ." Scand J Gastroenterol **42**: 602-10.
- Henriksen M, Jahnsen J, Lygren I, Sauar J, Kjellevoid Ø, Schulz T, Vatn MH, Moum B; IBSEN Study Group. Group. (2006). "Ulcerative colitis and clinical course: results of a 5-year population-based follow-up study (the IBSEN study)." Inflamm Bowel Dis. 2006 Jul;12(7):543-50. **12**(7): 543-50.
- Ho"lta" V, Klemetti P, et al. (2008). "IL-23/IL-17 Immunity as a Hallmark of Crohn's Disease." Inflamm Bowel Dis **14**: 1175–1184
- Hogan SP, Waddell A and Fulkerson PC. (2013). "Eosinophils in infection and intestinal immunity." Curr Opin Gastroenterol **29**: 7-14.
- Hogan SP (2009). "Functional Role of Eosinophils in Gastrointestinal Inflammation." Immunol Allergy Clin N Am **29**: 129-140.
- Høivik ML, Moum B, Solberg IC, Henriksen M, Cvancarova M, Bernklev T. (2013). "Work disability in inflammatory bowel disease patients 10 years after disease onset: results from the IBSEN Study." Gut **62**(3): 368-75.

- Jenkins D, Balsitis M, et al. (1997). "Guidelines for the initial biopsy diagnosis of suspected chronic idiopathic inflammatory bowel disease. The British Society of Gastroenterology Initiative." J Clin Pathol **50**(2): 93-105.
- Jiang H, Chess L. (2006). "Regulation of Immune Responses by T Cells." N Engl J Med **354**: 1166-76
- Jo Y, Matsumoto T, Yada S, Fujisawa K, Esaki M, Onai N, Matsushima K, Iida M. (2003). "CCR4 is an up-regulated chemokine receptor of peripheral blood memory CD4+ T cells in Crohn's disease." Clin Exp Immunol **132**(2): 332-8.
- Jump RL, Levine AD. (2004). "Mechanisms of natural tolerance in the intestine: implications for inflammatory bowel disease. ." Inflamm Bowel Dis **10**: 462-478.
- Kaser A, Zeissig S and Blumberg RS. (2010). "Inflammatory Bowel Disease." Annu Rev Immunol **28**: 573-621.
- Kato M, Kephart GM, Talley NJ, Wagner JM, Sarr MG, Bonno M, McGovern TW, Gleich GJ (1998). "Eosinophil infiltration and degranulation in normal human tissue." Anat Rec **252**(3): 418-25.
- Kayama H, Takeda K. (2012). "Regulation of intestinal homeostasis by innate and adaptive immunity." Int Immunol **24**(11): 673-80.
- Khor B, Gardet A, Xavier RJ. (2011). "Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease." Nature **474**(7351): 307-17.
- Kiran RP, Nisar PJ, Goldblum JR, Fazio VW, Remzi FH, Shen B, Lavery IC. (2012). "Dysplasia associated with Crohn's colitis: segmental colectomy or more extended resection?" Ann Surg **256**(2): 221-6.
- Kobayashi T, O. S., Hisamatsu T, Kamada N, Chinen H, Saito R, Kitazume MT, Nakazawa A, Sugita A, Koganei K, Isobe K, Hibi T. (2008). "IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. ." Gut **57**(12): 1682-9.
- Kornbluth A, Colombel JF, et al. (2005). "ICCE Consensus for Inflammatory Bowel Disease." Endoscopy **37**(10): 1051-1054.
- Kraus TA, Mayer L. (2005). "Oral tolerance and inflammatory bowel disease." Curr Opin Gastroenterol **21**: 692-96.
- Lamkhioued B, Abdelilah SG, et al. (2002). "The CCR3 Receptor Is Involved in Eosinophil Differentiation and Is Up-Regulated by Th2 Cytokines in CD34 Progenitor Cells." J Immunol **169**: 537-547.
- Lampinen M, Backman M, et al. (2008). "Different regulation of eosinophil activity in Crohn's disease compared with ulcerative colitis." J. Leukoc. Biol. **84**: 1392-1399.
- Lampinen M, Rönnblom A, Amin K, Kristjansson G, Rorsman F, Sangfelt P, Säfsten B, Wagner M, Wanders A, Winqvist O, Carlson M. (2005). "Eosinophil granulocytes are activated during the remission phase of ulcerative colitis." Gut. **54**(12): 1714-20.
- Lee SS, Kim AY, et al. (2009). "Crohn Disease of the Small Bowel: Comparison of CT Enterography, MR Enterography, and Small-Bowel Follow-Through as Diagnostic Techniques." Radiology **251**(3): 751-761.
- Leighton JA, Shen B, et al. (2006). "ASGE guideline: endoscopy in the diagnosis and treatment of inflammatory bowel disease." Gastrointest Endosc. **63**(4): 558-65.
- Lennard-Jones JE. (1989). "Classification of Inflammatory Bowel Disease." Scand J Gastroenterol **24**(s170): 2-6.

- Lennard-Jones JE, Shivananda S. (1997). Clinical uniformity of inflammatory bowel disease presentation and during the first year of disease in the north and south of Europe. EC-IBD Study Group. Eur J Gastroenterol Hepatol. 1997 Apr;9(4):353-9.
- Lichtenstein GR, Hanauer SB, et al. (2009). "Management of Crohn's Disease in Adults." Am J Gastroenterol **104**: 465–483.
- Liu Z, Yadav PK, et al. (2009). "Potential role of Th17 cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease." World J Gastroenterol **15**(46): 5784-5788
- Loftus EV Jr (2004). "Clinical Epidemiology of Inflammatory Bowel Disease: Incidence, Prevalence, and Environmental Influences." Gastroenterol **126**: 1504–1517.
- Losana G, Bovolenta G, et al. (2002). "IFN- and IL-12 differentially regulate CC-chemokine secretion and CCR5 expression in human T lymphocytes." J. Leukoc. Biol. **72**: 735–742
- MacDonald TT, Monteleone G. (2005). "Immunity, Inflammation, and Allergy in the Gut." Science **307**: 1920-1925.
- MacKalski BA, Bernstein CN. (2006). "New Diagnostic Imaging Tools for Inflammatory bowel disease." Gut **55**: 733–741
- Maddur MS, Miossec P, Kaveri SV, Bayry J. (2012). "Th17 Cells Biology, Pathogenesis of Autoimmune and Inflammatory Diseases, and Therapeutic Strategies." Am J Pathol **181**: 8-18.
- Mannon PJ, Hornung RL, Yang Z, Yi C, Groden C, Friend J, Yao M, Strober W, Fuss IJ. (2011). "Suppression of inflammation in ulcerative colitis by interferon- β 1a is accompanied by inhibition of IL-13 production." Gut **60**: 449 -455.
- Manousou P, Kolios G, Drygiannakis I, Pyrovolaki K, Bourikas L, Papadaki HA, Kouroumalis E. (2008). "Expression of a splice variant of CXCR3 in Crohn's disease patients; indication for a lymphocyte–epithelial cell interaction." J Gastroenterol Hepatol **23**: 1823-1833.
- Martland GT, Shepherd NA. (2007). "Indeterminate colitis: definition, diagnosis, implications and a plea for nosological sanity." Histopathol **50**: 83-96.
- Matsui T, Yao T, et al. (2003). "Clinical features and pattern of indeterminate colitis: Crohn's disease with ulcerative colitis-like clinical presentation." J Gastroenterol **38**: 647–655.
- Moum FB, A Ekbom, MH Vatn, E Aadland, J Sauar. (1997). "diagnosis in a prospective population based study Inflammatory bowel disease: re-evaluation of the in south eastern Norway." Gut **40**: 328-332.
- Nasseri Y, Melmed G, Wang HL, Targan S, Fleshner P. (2010). "Rigorous Histopathological Assessment of the Colectomy Specimen in Patients With Inflammatory Bowel Disease Unclassified Does Not Predict Outcome After Ileal Pouch – Anal Anastomosis." Am J Gastroenterol **2010**; **105**: 155–161.
- Nikolaus S, Schreiber S. (2007). "Diagnostics of Inflammatory Bowel Disease." Gastroenterol **133**: 1670–1689.
- Odze R (2003). "Diagnostic Problems and Advances in Inflammatory Bowel Disease." Mod Pathol **16**(4): 347–358

- Oki M, Ohtani H, et al. (2005). "Accumulation of CCR5⁺ T cells around RANTES + granulomas in Crohn's disease: a pivotal site of Th1-shifted immune response?" Laboratory Investigation **85**:137–145
- Papadakis KA, Tabibzadeh S. (2002). "Diagnosis and misdiagnosis of inflammatory bowel disease." Gastrointest Endoscopy Clin N Am **12**: 433– 449.
- Pascal RR, Gramlich TL, Parker KM, Gansler TS. (1997). "Geographic variations in eosinophil concentration in normal colonic mucosa." Mod Pathol **10**(4): 363-5.
- Pierik M, De Hertogh G, et al. (2005). "receptors, and phenotypes of Crohn's disease Epithelioid granulomas, pattern recognition." Gut **54**: 223-227.
- Polydorides AD, Banner BF, Hannaway PJ, Yantiss RK. (2008). "Evaluation of site-specific and seasonal variation in colonic mucosal eosinophils." Hum Pathol **39**(6): 832-6.
- Pontte ACA, Damião AOMC, et al. (2010). "Consensus Guidelines for the Management of Inflammatory Bowel Disease. Brazilian Study Group of Inflammatory Bowel Diseases." Arq Gastroenterol **47**(3): 313-325.
- Price AB (1978). "Overlap in the spectrum of non-specific inflammatory bowel disease 'colitis indeterminate'." J Clin Pathol **31**: 567-577.
- Romberg-Camps MJL, Dagnelie PC, et al. (2009). "Influence of Phenotype at Diagnosis and of Other Potential Prognostic Factors on the Course of Inflammatory Bowel Disease." Am J Gastroenterol **104**: 371-383.
- Rothenberg ME, Hogan SP. (2006). "The Eosinophil." Annu. Rev. Immunol. **24**: 147-74.
- Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, et al. (2005). "Infliximab for Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis." N Engl J Med **353**: 2462-76.
- Sachar DB (2007). "What Is the Role for Endoscopy in Inflammatory Bowel Disease?" Am J Gastroenterol **102**: S29–S31
- Sandborn WJ, Gasink C, Long-Long Gao, Blank MA, et al. (2012). "Ustekinumab Induction and Maintenance Therapy in Refractory Crohn's Disease." N Engl J Med **367**: 1519-28.
- Sandborn WJ, Ghosh S, Panes J, Vranic I, et al. (2012). "Tofacitinib, an Oral Janus Kinase Inhibitor, in Active Ulcerative Colitis." N Engl J Med **367**: 616-24.
- Sands BE (2004). "From Symptom to Diagnosis: Clinical Distinctions Among Various Forms of Intestinal Inflammation." Gastroenterol **126**: 1518–1532.
- Sarra M, Pallone F, et al. (2010). "IL-23/IL-17 Axis in IBD." Inflamm Bowel Dis. **16**(10): 1808-13
- Sasaki Y, Tanaka M, Kudo H. (2002). "Differentiation between ulcerative colitis and Crohn's disease by a quantitative immunohistochemical evaluation of T lymphocytes, neutrophils, histiocytes and mast cells." Pathol Int. **52**(4): 277-85.
- Schenk M, Mueller C. (2008). "The mucosal immune system at the gastrointestinal barrier." Best Pract Res Clin Gastroenterol **22**(3): 391-409. .
- Schwartz DA, Loftus Jr EV, Tremaine WJ, Panaccione R, Harmsen WS, Zinsmeister AR, et al. (2002). "The natural history of fistulizing Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota. ." Gastroenterol **122**(4): 875–80.
- Seldenrijk CA , Morson BC, Meuwissen SG, et al. (1991). "Histopathological evaluation of colonic mucosal disease: biopsy specimens in chronic inflammatory bowel diagnostic implications." Gut **32**: 1514-1520.

- Shale M, Ghosh S. (2008). "Beyond TNF, Th1 and Th2 in inflammatory bowel disease." Gut **57**: 1349-1351.
- Shanahana F, Bernstein CN. (2009). "The evolving epidemiology of inflammatory bowel disease." Curr Opin Gastroenterol **25**(4): 301-5.
- Shen B (2007). "Endoscopic, Imaging, and Histologic Evaluation of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis." Am J Gastroenterol **102**: S41–S45.
- Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, et al. (2005). "Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology." Can J Gastroenterol **19**(suppl A): 5-36.
- Spencer LA, Weller PF. (2010). "Eosinophils and Th2 immunity: contemporary insights." Immunol Cell Biol. **88**(3): 250-256.
- Stange EF, Travis SPL, et al. (2008). "European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Definitions and diagnosis." J Crohns Colitis **2**: 1–23.
- Strober W, Fuss IJ. (2011). "Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. ." Gastroenterol **140**(6): 1756-67
- Swan NC, Geoghegan JC, O'Donoghue DP, et al. (1998). "Fulminant colitis in inflammatory bowel disease: detailed pathologic and clinical analysis." Dis Colon Rectum **41**(1511–1515.).
- Solem CA, Loftus EV, Fletcher JG, Baron TH, Gostout CJ, Petersen BT, et al. (2008) Small-bowel imaging in Crohn's disease: a prospective, blinded, 4-way comparison trial. Gastrointest Endosc **68**: 255-66.
- Talbot IC (2005). "Indeterminate colitis: A pathologist's view." Dig Liv Dis **37**: 713–715
- Tanaka M, Riddell RH, et al. (1999). "Morphologic Criteria Applicable to Biopsy Specimens for Effective Distinction of Inflammatory Bowel Disease from Other Forms of Colitis and of Crohn's Disease from Ulcerative Colitis." Scand J Gastroenterol **34**: 55-67.
- Targan SR, Karp LC. (2007). "Inflammatory bowel disease diagnosis, evaluation and classification: state-of-the art approach." Curr Opin Gastroenterol **23**: 390-394.
- Theodossi A, Spiegelhalter DJ, Jass J, Firth J, Dixon M, et al. (1994). "Observer variation and discriminatory value of biopsy features in inflammatory bowel disease." Gut **35**(7): 961-8.
- Thia KT, Sandborn WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR, et al. (2010). "Risk Factors Associated With Progression to Intestinal Complications of Crohn's Disease in a Population-Based Cohort." Gastroenterol **139**: 1147-1155.
- Thompson EM, Price AB, Altman DG, et al. (1985). "Quantitation in inflammatory bowel disease using computerized interactive image analysis. ." J Clin Pathol **38**: 631-8.
- Van Assche G, Dignass A, Panes J, Beaugerie L, Karagiannis J, Allez M, et al. (2010). "The second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis." J Crohn's Colitis **4**: 7-27.
- Van Kampen C, Gauldie J, et al. (2005). "Proinflammatory properties of IL-4 in the intestinal microenvironment." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **288**: G111–G117
- Vermeire S, Van Assche G, et al. (2011). "Inflammatory bowel disease and colitis: new concepts from the bench and the clinic." Curr Opin Gastroenterol **27**: 32–37

- Wedemeyer J, Vosskuhl K. (2008). "Role of gastrointestinal eosinophils in inflammatory bowel disease and intestinal tumours." Best Pract Res Clin Gastroenterol **22**(3): 537-549.
- Wells AD, McMillan I, Price AB, Ritchie JK, Nicholls RJ. (1991). "Natural history of indeterminate colitis." Br J Surg **78**: 179-181.
- Wolters FL, Russel MG, Sijbrandij J, et al. (2006). "Phenotype at diagnosis predicts recurrence rates in Crohn's disease . Gut 2006 ; 55 : 1124 – 30." Gut **55**: 1124 – 30
- Yantiss RK, Odze RD. (2007). "Pitfalls in the Interpretation of Nonneoplastic Mucosal Biopsies in Inflammatory Bowel Disease." Am J Gastroenterol **102**: 890–904.
- Yantiss RK, Odze RD. (2009) Optimal Approach to Obtaining Mucosal Biopsies for Assessment of Inflammatory Disorders of the Gastrointestinal Tract. Am J Gastroenterol **104**: 774–783.
- Zimmerman NP, Vongsa RA, et al. (2008). "Chemokines and Chemokine Receptors in Mucosal Homeostasis at the Intestinal Epithelial Barrier in Inflammatory Bowel Disease." Inflamm Bowel Dis **14**: 1000-1011.

ANEXO I

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você é portador de uma doença inflamatória do intestino (retocolite ulcerativa ou doença de Crohn) e está em acompanhamento no ambulatório do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Atualmente se sabe que estas doenças são crônicas com períodos de melhora e de piora conforme a atividade da inflamação. O tratamento tem por objetivo principal evitar estes períodos de piora. A retocolite ulcerativa e a Doença de Crohn possuem características diferentes, no entanto existem casos em que estas doenças podem ser muito parecidas dificultando a diferenciação entre uma e outra. Existem tratamentos e decisões no manejo destas duas doenças que são diferentes, portanto é importante que os médicos possam ter certeza absoluta de qual das duas doenças o paciente sofre. Assim, podem escolher as melhores alternativas de tratamento para cada caso.

Algumas vezes você necessita realizar o exame de colonoscopia para avaliação e acompanhamento de sua doença. Durante a colonoscopia sempre são coletadas amostras do intestino para serem examinadas por exame microscópico (biópsias).

Você está sendo convidado a participar de um estudo que irá analisar características do intestino e sua inflamação e que possam ajudar os médicos a fazer o diagnóstico quando há dúvidas de qual tipo de inflamação uma determinada pessoa tem. No seu caso, os médicos que lhe acompanham no ambulatório já têm certeza de que tipo de inflamação você está tratando. O objetivo deste estudo é que através do exame das amostras coletadas do intestino dos pacientes que já tem seu diagnóstico confirmado possam ajudar os médicos a definir o caso de outras pessoas que ainda não tem a certeza de que sofrem de Doença de Crohn ou Retocolite ulcerativa.

Você não será submetido a nenhum exame além daquele que for necessário para o cuidado e acompanhamento do seu caso, apenas para que seja estudado. Os pesquisadores apenas aproveitaram amostras de intestino que já foram coletadas em exames prévios ou que você venha a fazer por necessidade de acompanhamento da sua doença.

Não se preocupe, se não quiser participar do estudo isto não prejudicará seu tratamento ou seu acompanhamento no ambulatório. O seu atendimento continuará da mesma forma como tem sido até agora.

Caso durante o período de estudo a medicina descubra um novo método diagnóstico das doenças intestinais você será notificado e terá a opção de se retirar deste estudo.

Os registros de sua participação neste estudo serão conservados como confidenciais, de acordo com o permitido por lei. Se os resultados do estudo forem publicados sua identidade permanecerá confidencial. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e os investigadores têm o compromisso de publicá-lo como contribuição ao bem estar da população.

Consentimento:

Declaro que li e entendi as informações contidas neste documento. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas elas foram respondidas satisfatoriamente. Estou assinando este termo de consentimento voluntariamente, mostrando minha concordância em participar deste estudo, até que eu decida ao contrário.

Nome e assinatura do (a) paciente

Nome e assinatura da testemunha

(se necessário)

Nome e assinatura do investigador

Data

Pesquisadores responsáveis: Protocolo: 07310

Dra. Luiz Meurer fone:33328088

Cristina Flores MD fone: 99624012

ANEXO II

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (p/ controles)

Você está realizando um exame de colonoscopia por solicitação de seu médico. Durante este exame será examinado todo seu intestino grosso. Quando o médico que está realizando o exame encontra alguma alteração são coletadas amostras do seu intestino (biópsias). A coleta de amostras é um procedimento indolor e com risco mínimo de perfuração intestinal (0,1%).

Esta sendo realizada no Hospital de Clínicas de Porto Alegre uma pesquisa que tem por objetivo buscar dados que possam ajudar a fazer diagnóstico mais preciso de doenças chamadas de Doenças Inflamatórias Intestinais. Os pacientes portadores desta doença sempre necessitam fazer este mesmo exame que o Sr (a) está realizando, onde sempre são coletas estas amostras. Estamos verificando quais as alterações mais frequentes nos portadores da doença e é necessário compará-las com pessoas que não tem a doença. Assim sendo, como o Sr (a) não é portador de nenhuma doença com inflamação do intestino, poderia auxiliar os pesquisadores permitindo a coleta de 4 fragmentos de biópsia para que possamos compará-las com as amostras de pessoas doentes.

O Sr (a) está sendo convidado a participar deste estudo que pode ajudar os médicos a fazer o diagnóstico destas doenças inflamatórias do Intestino. Os pesquisadores acreditam que a coleta destas amostras não traz nenhum prejuízo para o Sr (a), porém não se preocupe, se não quiser participar do estudo isto não prejudicará seu tratamento ou seu acompanhamento no ambulatório. O seu atendimento continuará da mesma forma como tem sido até agora.

Caso durante o período de estudo os médicos descubram alguma alteração inesperada nas amostras coletadas no seu exame o Sr (a). será notificado.

Os registros de sua participação neste estudo serão conservados como confidenciais, de acordo com o permitido por lei. Se os resultados do estudo forem publicados sua identidade permanecerá confidencial. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e os investigadores têm o compromisso de publicá-lo como contribuição ao bem estar da população.

Consentimento:

Declaro que li e entendi as informações contidas neste documento. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas elas foram respondidas satisfatoriamente. Estou assinando este termo de consentimento voluntariamente, mostrando minha concordância em participar deste estudo, até que eu decida ao contrário.

Nome e assinatura do (a) paciente

Nome e assinatura da testemunha
(se necessário)

Nome e assinatura do investigador

Data

Pesquisadores responsáveis:

Dra. Luise Meurer fone:33328088

Cristina Flores MD fone: 99624012

Protocolo : 07310

ANEXO III

PROJETO PILOTO

Foram selecionados 10 pacientes com RCU e 10 pacientes com DC em acompanhamento no Ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais do Serviço de Gastroenterologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre entre 2007 e 2010. Os dados foram coletados sistematicamente nos últimos 5 anos. O diagnóstico de certeza foi estabelecido pelos critérios tradicionais dos achados clínicos, endoscópicos, radiológicos e histopatológicos, e reforçados pela evolução clínica {Lennard-Jones JE., 1989 #156}. Como grupo controle foram coletadas amostras de biópsias de cólon direito e cólon esquerdo de 10 pacientes assintomáticos que realizaram colonoscopia por história familiar de câncer colorretal ou controle de pólipos nos quais o exame endoscópico demonstrou completa ausência de lesões.

Todos os fragmentos foram visualizados em busca dos critérios histopatológicas para o diagnóstico de DII e a contagem de eosinófilos. Foi realizada avaliação semiquantitativa em 10 campos consecutivos de grande aumento (400x), nos fragmentos de biópsias retirados do segmento mais alterado verificando a proporção de células inflamatórias que eram positivas. Os marcadores utilizados, levando-se em consideração a que linhagem de linfócitos estes representavam foram:

1. Linfócitos TH1: CCR5, IL-12, IFN γ
2. Linfócitos TH2: CCR3, CD30, IL-13.

Todos os anticorpos utilizados foram da marca Abcam (Abcam, Cambridge, MA): Anti-CCR3 (ab1667), Anti-CCR5 (ab1673), Anti-IL12 p40 (ab62822), Anti-Interferon gamma (ab9657), Anti-CD30 (ab23766) e Anti-IL13 (ab106732).

Resultados do Projeto piloto

A análise semiquantitativa da marcação imuno-histoquímica do CCR5, CCR3, IL-12, IL-13 e IFN γ foram divididas em intervalos de menos de 10% de células marcadas, entre 10 e 50% e acima de 50%. A variável que apresentou diferença significativa entre casos e controles foi o marcador CCR3 e CD30. No entanto a avaliação semiquantitativa das células positivas com o CCR3 não mostrou diferença estatisticamente significativa com potencial para discriminar entre DC e RCU. A marcação das citocinas IL-12, IL-13, IFN γ e da quimiocina CCR5 não apresentaram valor discriminatório entre os casos e os controles.

A mediana de eosinófilos avaliada no cólon direito dos casos foi de 65 células por campo de grande aumento contra 29 células dos controles ($p=0,011$). No cólon esquerdo os casos apresentaram uma mediana de 44 céls/CGA e de 7 céls/CGA nos controles ($p=0,016$).

Quanto ao CD30, além de uma diferença significativa entre casos e controles, a avaliação quantitativa do somatório de células positivas deste marcador apresentou uma média de 9,777 ($DP \pm 6,704$) na DC e de 27,222 ($DP \pm 22,697$) na RCU, $p= 0,063$.

Diante dos resultados do projeto piloto procedeu-se o estudo de 185 pacientes (105 pacientes com DC e 80 com RCU), sendo analisados os parâmetros sugeridos pela diferença estatística potencialmente significativa das variáveis listadas abaixo:

7. Extensão do processo inflamatório para a submucosa
8. Presença de granuloma na lâmina própria ou submucosa, portanto não associado ao epitélio cripto-glandular.
9. Variabilidade de acometimento entre os fragmentos que caracteriza a presença ou ausência de uniformidade do processo inflamatório
10. Presença de erosão aftóide
11. Contagem do número absoluto dos eosinófilos no segmento mais afetado em óptica de 400x (cada campo de grande aumento no microscópio utilizado corresponde a 500 μ)
12. Soma da contagem absoluta de células marcadas pelo CD30 em 10 campos de grande aumento(400x), no segmento mais alterado

Foram também avaliadas outras características consideradas com potencial discriminatório entre a DC e a RCU: variabilidade de danos e alterações entre os fragmentos coletados dentro de um mesmo segmento, extensão do processo inflamatório para a submucosa, presença de fissuras, erosões aftóides, metaplasia pilórica no íleo terminal, granulomas não associados à ruptura de criptas (tipo epitelióide na lâmina própria ou na submucosa). Para a contagem de eosinófilos, a área de maior densidade eosinofílica foi selecionada com óptica de aumento médio (100x), considerando-se a contagem absoluta em grande aumento (400x = 500 μ).

ANEXO IV

ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

Original paper

Quantitative assessment of CD30⁺ lymphocytes and eosinophils for the histopathological differential diagnosis of inflammatory bowel disease

Cristina Flores; Carlos Fernando Francesconi; Luíse Meurer.

Affiliation(s):

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Medical School, Federal University of Rio Grande do Sul

Postgraduate Program: Gastroenterology and Hepatology Sciences

Corresponding Author:

Cristina Flores

Address: Av. Cristovao Colombo, 2424 ap. 111

ZIP code: 90560-002 – Floresta

Porto Alegre/RS/Brasil

Telephone: +55 51 99624012

e-mail: cfloresgastro@gmail.com

Keywords: Crohn's disease, ulcerative colitis, CD30, histopathology, inflammatory bowel disease

Word count: 1967.

ABSTRACT

Objective: To quantitate CD30⁺ lymphocytes and eosinophils for the histopathological discrimination of Crohns' disease (CD) and ulcerative colitis (UC).

Design: 185 patients were diagnosed with inflammatory bowel disease (IBD) by a gastroenterologist and corroborated by five years of follow up. Patients were treatment naïve at the time of biopsy. Samples were taken from diseased areas of the colon and examined by an experienced gastrointestinal pathologist.

Results: The median number of eosinophils in biopsies taken from the affected segment was 42 (25.5–63.5) in CD and 107 (67–123) in UC ($p < 0.001$). Biopsies containing ≥ 70 eosinophils had a sensitivity of 78.3% and a specificity of 71% for the diagnosis of UC (area under the ROC curve 0.767 (CI 95%: 0.696–0.838)). A median of three cells (2-6) were found in diseased CD biopsies and 33 CD30⁺ cells (24-52) in diseased UC biopsies ($p < 0.001$). The cut off determined by the ROC curve was 15 (sensitivity 97.5%, specificity 94.3%, PLR 17.1, NLR 0.03, AUC: 0.967; 95% CIs 0.941 - 0.993). After a value was assigned to each variable based on their contribution to the diagnosis, a histopathological score out of ten was devised for the diagnosis of CD. When the score was ≥ 5 , the specificity was 100% and the sensitivity 86.8%.

Conclusion: Routine histopathological assessment along with quantification of CD30⁺ cells is highly accurate for discriminating between CD and UC. All the measured parameters are easy to perform, low-cost, and available in most pathological laboratories.

SUMMARY

What is already known?

- The clinical and histopathological diagnosis of ulcerative colitis and Crohn's disease can be difficult.
- No single histopathological feature or biomarker is suitably specific or sensitive to secure the diagnosis of UC or CD.

What are the new findings?

- CD30+ lymphocytes can be measured in biopsies from patients with IBD using immunohistochemistry. This evaluation can be used to aid the diagnosis of CD or UC.
- Eosinophils are present in greater numbers in colonic biopsies from patients with UC and can also be used to refine the diagnosis.

What is the impact on future clinical practice?

- This simple scoring system using readily available histopathological tools can be used to improve diagnostic decision-making in any pathological laboratory.
- This will improve treatment planning for patients particularly in the era of personalised medicine.

INTRODUCTION

Inflammatory bowel disease (IBD) is a group of inflammatory disorders of the intestine and is frequently chronic and disabling with significant morbidity. IBD is a multifactorial disease resulting from inappropriate innate and acquired immune responses to commensal microbiota in genetically susceptible individuals.

The two major types of IBD are Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). The diagnoses of CD and UC are usually made on clinical grounds supplemented with objective radiological, endoscopic, and histological findings. The histological distinction between CD and UC is based on a wide range of criteria, and although there have been attempts to quantify these parameters interpretation remains subjective and no one feature is pathognomonic [1, 2]. Therefore there is no single gold standard test and sometimes concrete diagnosis remains a problem for both gastroenterologists and pathologists. Even using a multimodal diagnostic approach, clinicians and pathologists are unable to distinguish between CD affecting the colon and UC in 10–20% of cases of colonic IBD, often because a single defining histological characteristic is neither present nor absent in these cases [3, 4]. As medical and surgical therapeutic options become tailored towards each patient's disease phenotype, accurate disease classification becomes even more critical to the management of patients with colonic IBD.

While innate immune responses are activated in both CD and UC, the CD4 T_H2-like subgroup of lymphocytes are mainly activated in UC. These lymphocytes express CD30 in their plasma membrane and produce eosinophil-activating cytokines. We therefore

hypothesised that there would be differential CD30 expression in the lymphocytes seen in CD and UC biopsies. We evaluated the significance of CD30 expression by immunohistochemistry (IHC), along with eosinophil count and histopathological features, in order to improve the histopathological differential diagnosis of IBD.

PATIENTS AND METHODS

Biopsy samples from 185 patients were evaluated in this study; 105 patients with CD and 80 with UC. Patients were managed in a specialised gastroenterology clinic of the Porto Alegre of Clinics University Hospital between 2007 to 2010. The diagnoses of CD and UC were based on well-established clinical, endoscopic, histological, and radiological criteria as previously described [1]. The diagnosis of all cases was reviewed by a specialised gastroenterologist and corroborated by five years of clinical follow-up. General variables included in the analysis were age, sex, UC extension, and CD behaviour and location as defined by the Montreal classification [5].

Different health professionals took the first colonoscopy or surgical tissue samples for each patient as part of routine care. All patients were treatment naive at the time of sample collection and had active disease. A single experienced gastrointestinal pathologist re-evaluated the biopsies, blinded to the previous diagnosis. Histopathological variables were categorised according to the criteria defined by Jenkins *et al.* (Jenkins D, Balsitis M *et al.* 1997).

The sample size was calculated based on the results of a pilot project, in which ten controls (asymptomatic patients who underwent colonoscopy because of a family history of colorectal cancer and with no visible endoscopic changes), ten UC patients, and ten CD patients were studied. This resulted in a requirement for 49 patients in each group in order to detect a difference of at least 30% between the groups of patients with CD and UC using CD30 IHC. Patients with HIV and those taking medications for IBD were

excluded from the study. The quantity of eosinophils was evaluated by absolute counting (high power field – 400x) in the area of highest eosinophilic density in the most abnormal fragment. Anti-CD30 antibodies (Abcam 23766 at a dilution of 1:100) were used to assess CD30 expression. CD30 expression was assessed by counting the number of positive cells in ten consecutive high power fields (400x), also in the most affected segment.

Ethics

Informed consent was obtained from all individuals invited to participate in the study using a patient information leaflet. The study was approved by the regional ethics committee.

Statistics

Continuous variables were expressed as median and interquartile range. Categorical variables were described by absolute and relative frequencies. Continuous data were tested for normality using the Kolmogorov-Smirnov test and those with a skewed distribution were compared using non-parametric tests. When comparing continuous variables with a symmetric distribution, the Student's t-test for independent samples was applied. In the case of asymmetry, the Mann-Whitney test was used.

The chi-square test or Fisher's exact test was used to compare proportions between groups. To complement these analyses, tests of the adjusted residuals were applied.

Histopathological variables with discriminatory potential were analysed, with the intention of constructing a diagnostic scoring algorithm. Receiver operating characteristic (ROC) curves were assessed to determine the cut off points for eosinophils, CD30, and the score that best diagnosed Crohn's disease. Sensitivity, specificity, positive and negative likelihood ratios, and the area under the curve for the cut-offs for the variables were calculated.

The level of statistical significance was 5% ($p < 0.05$), and all analyses were performed using SPSS version 18.0.

RESULTS

The records of 105 CD patients and 80 UC patients were reviewed. The mean age at diagnosis was 32.4 years (14-64, SD \pm 13.1) for CD patients and 39.1 (17-69, SD \pm 13.4) for UC patients. 51.4% of CD patients and 48.8% of UC patients were male. Almost half of the patients with UC (39; 49.4%) had pancolitis, 32 (40.5%) left colitis, and 8 (10.1%) proctitis alone. Thirty-three CD patients 33 (31.7%) had disease confined to the ileum, 35 (33.7%) had disease exclusively in the colon, and 30 (28.8%) ileocolonic disease.

Of all the pathological variables assessed, extension of the inflammatory process in to the submucosa, presence of granulomata, aphthous erosion, and variability of the disease involvement between fragments statistically contributed to the differential diagnosis. CD presented with inflammatory pattern in 53 (50.5%), a stenotic pattern 39 (37.1%), and penetrating pattern in 13 (12.4%) of patients. Of all patients, 33 (31.4%) had perianal disease. The full clinicopathological features of the study population are presented in Table 1.

We next evaluated the association of each histopathological characteristic with the diagnosis of CD or UC; those with statistically significant differences are shown in Table 2. All the histopathological variables together had an accuracy (proportion of correct answers, i.e., the total of true positives and negatives) of 69.1% for differentiating between CD and UC.

The median of the sum of the eosinophil count in each segment assessed per higher power field and their percentages are shown in Table 3. The number of eosinophils was significantly higher in the colon and rectum in UC. Taking a cut-off of ≥ 70 eosinophils, the sensitivity of the presence or absence of eosinophils was 78.3% and the specificity 71.0% for the diagnosis of UC, with an AUC of 0.767 (95% CIs 0.696 to 0.838).

There was a median number of 3 (2-6) CD30⁺ cells in CD patients and 33 (24-52) CD30⁺ cells in UC patients. CD30⁺ cells tended to be clustered in the centres of lymphoid follicles (Table 4). Applying 15 or more CD30⁺ cells as the cut off, the sensitivity for diagnosis of UC was 97.5% and the specificity 94.3%. The AUC was 0.967 (95% CIs 0.941 to 0.993) and positive likelihood ratio 17.1 (Figure 2).

The number of eosinophils, number of CD30⁺ cells, the distribution of CD30⁺ cells, extension of the inflammatory process in to submucosa, presence of granulomata, aphthous erosion, and variability of involvement between fragments were all discriminatory for the diagnosis of CD and UC. Given these results, values were assigned to each variable based on their statistical power, giving rise to a histopathological score out of ten for the diagnosis of CD diagnosis (Table 5).

When the sum of the variables was ≥ 5 the diagnostic score had a specificity of 100% and a sensitivity of 86.8% (Graphic 3) for CD; thus, the positive likelihood ratio tends to infinity. When a cut-off of ≥ 4 points was considered, the sensitivity was 95.3%, and the specificity 94.9%.

When CD patients whose ileum was the most affected segment were excluded, the sample size remained above the required power and the results were similar. The cut-offs remained the same in the ROC analysis, with a median number of 2 (25 and 75 percentiles of 1 and 6, respectively) CD30⁺ cells in the CD group, and 33 (25 and 75 percentiles of 24 and 52, respectively) CD30⁺ cells in the UC group (p <0.001).

DISCUSSION

To the best of our knowledge, this is the first study of the diagnostic utility of CD30 for the assessment of IBD in colonic biopsies. The distinction between UC and CD remains a difficult task for clinicians and pathologists particularly in non-specialised centres, since there is an overlap between histopathological features in many cases. The use of existing histopathological parameters in the diagnosis of IBD has plateaued [3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12], and there remains a need to explore the use of ancillary tests to improve diagnostic accuracy. The pathophysiology of UC is at least partly distinct from CD [13, 14]. T_H2-like lymphocytes are more likely to participate in the pathophysiology of UC, expressing CD30 at their surface and producing interleukins (mainly IL-5 and IL-13) that recruit and activate eosinophils [15, 16].

Based on this, we hypothesized that the number of CD30⁺ cells and eosinophils would be greater in biopsies from patients with UC than CD. In this study we selected four histopathological characteristics with discriminatory power, which when taken together achieved a diagnostic accuracy of 69.1%. Although the existing literature are heterogeneous and prevent direct comparison, our results appear to be comparable to most other studies, which report diagnostic accuracy from 60 to 75% using histological criteria [10, 12, 17, 18, 19].

Studies assessing the diagnostic utility of the number and activation of eosinophils in IBD reveal conflicting results. This might be explained by the fact that the samples evaluated were heterogeneous and collected at different times during the disease (e.g.

activity versus remission) [20, 21, 22], or during active therapy. Indeed, there remains a problem in defining the 'normal' number of eosinophils in colonic biopsies, nevertheless the number found in UC and CD. The patients assessed in our study were selected to be more homogeneous, and all biopsies were collected early in the disease without drug influence. Identifying eosinophils using H&E staining is technically easy and therefore readily applicable to the diagnostic scoring system. This study clarifies that the eosinophil count in UC is significantly higher in all colonic segments. However, since the use of eosinophil numbers alone has a high false positive and false negative rate, this parameter cannot be used alone to increase diagnostic accuracy. Other studies have shown showed no differences in eosinophil number in CD and UC [20, 21, 23].

It has been shown that T_H2 lymphocytes express the CD30 antigen on their cell surface, which is also expressed in Hodgkin lymphoma cells. The monoclonal antibody to CD30 has been used since 1982, and is well standardized and widely available [24]. The quantitative evaluation and distribution pattern of CD30 is a promising diagnostic tool, since no other marker used alone has shown such high sensitivity and specificity for the diagnosis of IBD subtypes. Our study has allowed the construction of a simple score that assists in the objective evaluation of diagnostic parameters with high specificity.

However, this study has a few limitations. There may be variability in the number and location of the biopsies collected, since the biopsy process was not standardised and was part of routine practice. Our cohort specifically included patients in the early stages of their disease and without the influence of medication. These results need validating in

a prospective study including patients in different stages of their disease and on treatment.

In conclusion, the routine assessment of histopathological features along with CD30⁺ cell count is a highly accurate tool in order to differentiate between CD and UC. All the described parameters can be easily and inexpensively performed by both general and specialist pathologists.

TABLES

Table 1. Clinicopathological characteristics of the study population

Variables assessed	CD (n=105)	UC (n=80)	p
Age at diagnosis (years) – mean ± SD	32.4 ± 13.1	39.1 ± 13.4	0.001
Sex – n(%)			0.832
Male	54 (51.4)	39 (48.8)	
Female	51 (48.6)	41 (51.3)	
UC extension – n(%)			-
Proctitis	-	8 (10.1)	
Left Colitis	-	32 (40.5)	
Pancolitis	-	39 (49.4)	
CD location – n(%)			-
Terminal ileum (L1)	33 (31.7)	-	
Colon (L2)	35 (33.7)	-	
Ileocolon (L3)	30 (28.8)	-	
L1 + L4 (upper GI)	4 (3.8)	-	
L2 + L4	2 (1.9)	-	
Perianal disease – n(%)			-
yes	33 (31.4)	-	
no	72 (68.6)	-	
Behaviour – n(%)			-
Inflammatory	53 (50.5)	-	
Stricturing	39 (37.1)	-	
Penetrating	13 (12.4)	-	

Table 2. Histopathological variables capable of assisting in the differential diagnosis between CD and UC

Variables	CD n=105 (%)	UC n=80 (%)	p
Histopathologic features – n(%)			
Extension in to submucosa	47 (44.3)	3 (3.8)	<0.001
Granulomata	36 (34.0)	0 (0.0)	<0.001
Variability between fragments	87 (82.1)	12 (15.2)	<0.001
Aphthous erosion	35 (33.0)	5 (6.3)	<0.001

Table 3. Quantitative assessment of eosinophils in each intestinal segment.

Eosinophils: median (P25 – P75)	N	CD (105)	N	UC (80)	
	CD		UC		
Ileum	77	32 (14 – 57)	10	15 (13 – 24)	0.072
Right Colon	80	29 (15 – 44)	43	50 (22 – 85)	0.016
Left Colon	84	18 (10 - 37)	78	84.5 (44 – 116)	<0.001
Rectum	43	31 (6 - 48,3)	54	94.5 (54 – 118)	<0.001
Most affected segment	105	42 (25,5 - 63,5)	80	107 (67 – 123)	<0.001

Table 4. Quantitative evaluation and distribution pattern of CD30 in the most altered segment.

CD30 – median (P25 - P75)	3 (2 – 6)	33 (24 – 52)	<0.001
Distribution– n(%)			<0.001
Cluster	18 (17.0)	53 (67.1)**	
Diffused	81 (76.4)**	11 (13.9)	
Cluster + Diffused	3 (2.8)	15 (19.0)**	
none	4 (3.8)	0 (0.0)	

** statistically significant by the test of adjusted residuals – significance 5%

Table 5. Histopathological scoring criteria for the diagnosis of CD

Variable	Cutoff	Points
Eosinophils in the most affected segment	< 70	2
CD30 ⁺ cells in the most affected segment	<15	2
CD30 diffuse pattern	-	1
Inflammation into submucosa	-	1
Granulomata	-	2
Variability between fragments	-	1
Aphthous erosion	-	1

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Histopathological images a. granulomata; b. variability of the disease involvement

Figure 2. The difference in median number of eosinophils in the most affected segment of the group of UC and CD. Median in CD 42 (25,5 –63,5) and median in UC 107 (67 – 123), $p < 0.001$

Figure 3. CD30⁺ cells versus CD30⁻ IHC

a. and b. RCU; c and d. DC

Figure 4. ROC curve to determine the CD30 cut-point for UC diagnosis.

Cut-off ≥ 15 (sensitivity=97.5%; specificity=94.3%; LR+=17.1; LR-=0.03; area under the curve: 0.967; 95% CIs: 0.941 – 0.993).

Figure 5. ROC curve to determine the cut off score for CD diagnosis.

Cutoff 5 (sensitivity=86.8%; specificity=100%; LR+= ∞ ; LR-=0.13; area under the curve: 0.994; 95% CIs: 0.988 – 1,000).

FIGURES FILES

FIGURE 1.

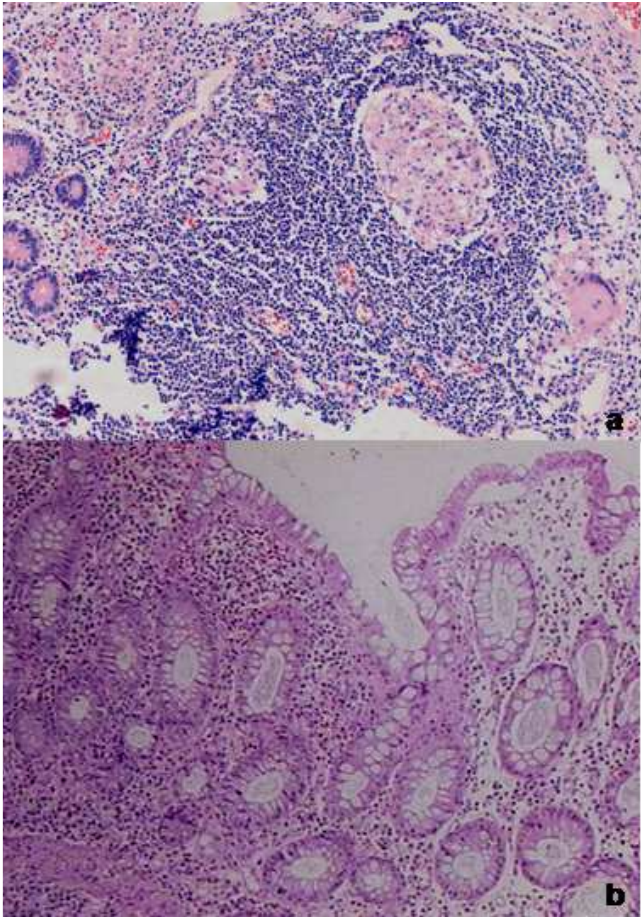


FIGURE 2.

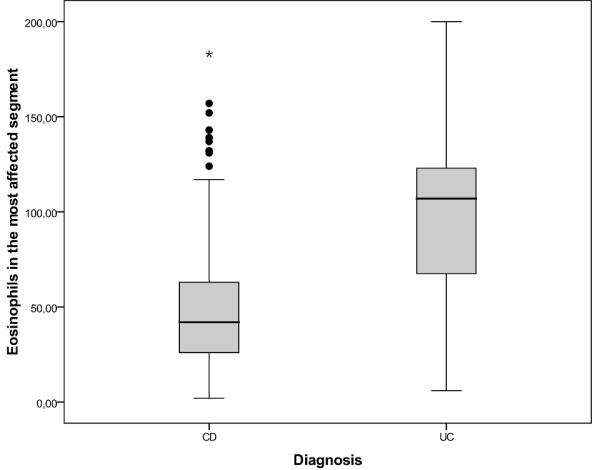


FIGURA 3.

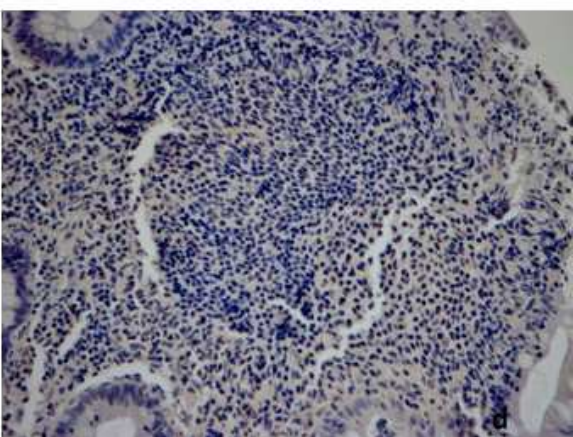
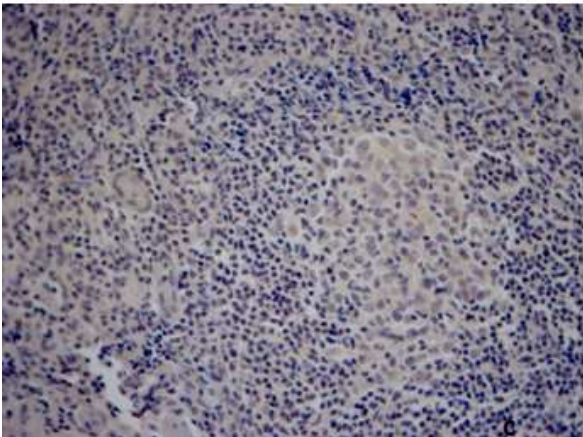
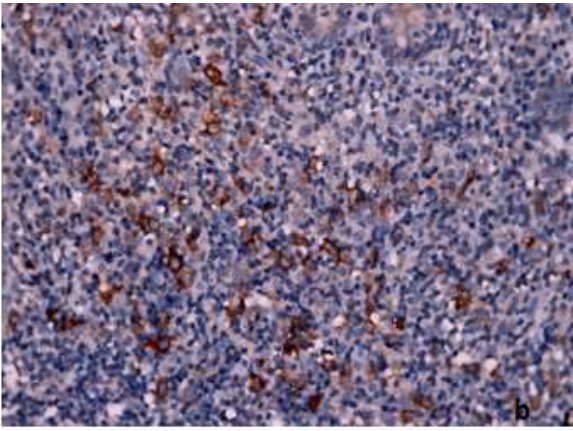
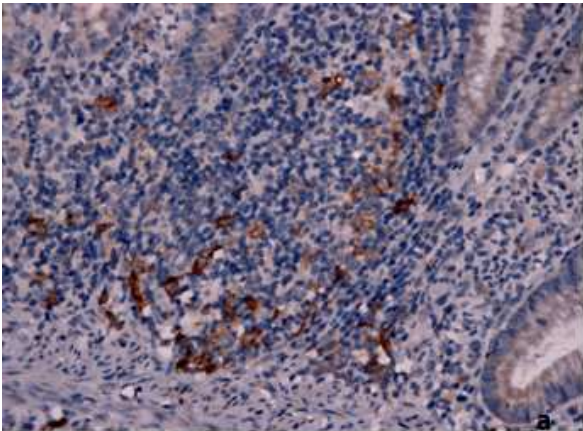


FIGURE 4.

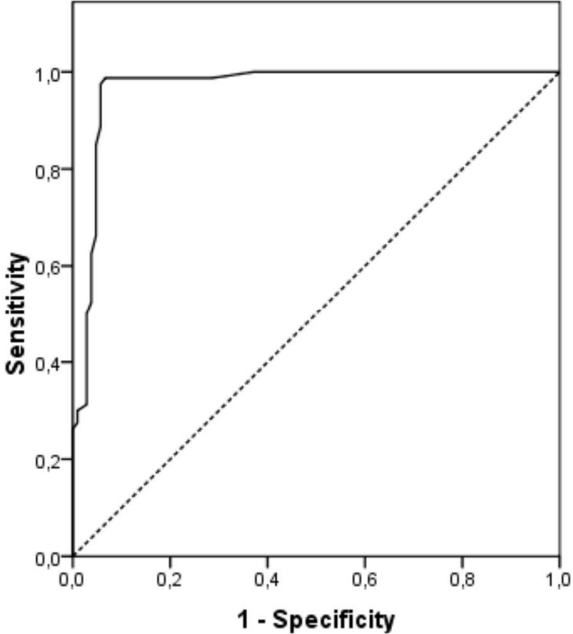


FIGURE 5.

